

Go Spatial 时空转录组 FF V1.3 转录组实验操作说明书



货号：401ST13114 (1cm*1cm)

试剂盒版本号：V1.3

适配硬件型号：Go Spatial-V2-24

文档编号：STOG01027

说明书版本号：A

版本历史

说明书版本：A
试剂盒版本：V 1.3
修订日期：2026 年 8 月
描述：首次发布

提示：请下载最新版说明书，与相应版本的试剂盒使用。

©法律声明。
2026 深圳华大三箭齐发科技有限责任公司保留所有权利。

1. 本产品仅用于研究，不用于诊断。
2. 本手册上的内容可能全部或部分受到适用的知识产权法的保护。深圳华大三箭齐发科技有限责任公司和 /或相应权利主体依法拥有其知识产权，包括但不限于商标权、版权等。
3. 深圳华大三箭齐发科技有限责任公司不授予或暗示使用我们或任何第三方的任何版权内容或商标（注册或未注册）的权利或许可。未经本单位书面同意，任何人不得擅自使用、修改、复制、公开传播、更改、分发或发布本手册的程序或内容，不得使用或利用设计技巧使用或占有本单位或本单位关联方的商标、标识或其他专有信息（包括图像、文本、网页设计或形式）。
4. 此处的任何内容都无意于或应被理解为对此处列出或描述的任何产品的性能的任何保证、表达或暗示。适用于本文所列任何产品的任何和所有保证均载于购买该产品所附的适用销售条款和条件。深圳华大三箭齐发科技有限责任公司不做任何保证，并在此声明对本文所述任何第三方产品或协议的使用不做任何保证。

工作流程



🕒 总耗时: ~1天



目录

第一章 产品介绍

1.1. 产品描述	1
1.2. 测序指南	1
1.3. 试剂套装组成	1
1.4. 适配的硬件	3
1.5. 需搭配的试剂耗材	3
1.6. 客户自备物料清单	4
1.7. Stereo-seq 芯片 T 载体介绍	7
1.8. 注意事项	8

第二章 样本准备

第三章 Go Spatial 时空转录组 FF V1.3 转录组实验标准操作流程

3.1. 实验前准备	12
3.2. 切片准备	14
3.3. 芯片处理与组织贴片	15
3.4. 组织固定	18
3.5. 荧光染色	19
3.6. 荧光拍照	21
3.7. Go Spatial 流程运行	23
3.7.1. Go Spatial 功能区介绍	23
3.7.2. Go Spatial 仪器准备	24
3.7.3. 上机试剂准备	26
3.7.4. 上机耗材准备	31
3.7.5. 载具安装	33
3.7.6. 程序信息录入	34
3.7.7. 流程开始	37
3.7.8. 多模块上样	39
3.7.9. 流程结束和 cDNA 回收	43
3.7.10. 设备机舱清洁	45
3.8. cDNA 变性	47
3.9. cDNA 扩增	48
3.10. cDNA 纯化	49

附录

附录 A 同一试剂盒“2+2”模式上机实验操作指引	52
附录 B Go Spatial 时空转录组 FF V1.3 吸头使用数量参考	55
附录 C 兼容 H&E 染色操作流程	56

- 

提示：额外的操作提示和指导。
- 

关键步骤：特别注意这些步骤，以避免实验失败或不好的结果。
- 

质量检查点
- 

注意：特别注意；操作不当或疏忽可能导致实验失败。
- 

停止点：您可以在这里暂停实验并存储样品。

第一章

产品介绍



1.1. 产品描述

华大智造（MGI）自研的时空自动化样本处理系统 Go Spatial-V2-24 可自动化批量化完成对新鲜冷冻（Fresh Frozen, FF）样本的时空转录组实验。目前该系统已适配 Stereo-seq 转录组试剂套装 V1.3 for Go Spatial。以上试剂套装中提供的所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了产品的稳定性和可重复性。

上述试剂套装采用的 Stereo-seq 时空转录组技术，是一种基于 DNBSEQ 高通量测序技术开发的、具有高分辨大视场的原位全转录组信息捕获技术。Stereo-seq 芯片 T（时空 poly-T 芯片）上载有核苷酸捕获探针，探针与组织切片结合后，通过探针原位抓取组织内的 mRNA 分子并进行 cDNA 合成。研究人员通过 DNBSEQ 测序和 STOmics 配套的可视化分析工具，可获取特定样本超高分辨率下的空间转录组信息。

1.2. 测序指南

使用本产品构建的测序文库可使用 DNBSEQ 测序平台进行测序。文库构建详情请参考 [《时空转录组 FF V1.3（含兼容 mIF）建库实验操作说明书》](#)。

1.3. 试剂套装组成

试剂套装的具体组分信息如下：

表格 1-1 Stereo-seq 转录组试剂套装 V1.3 for Go Spatial 产品信息

Stereo-seq 转录组试剂套装 V1.3 for Go Spatial 货号：401ST13114（4 RXN）		
组分货号	组分名称	规格和数量
401KT13114	Stereo-seq 转录组试剂盒 T	4 RXN*1
400CT13114	Stereo-seq 芯片 T 载体（1cm*1cm）-Dual	4 EA*1
310AK006	时空组学配件套装 -FF V1.3 Go Spatial	6 PCS*1



收到 Stereo-seq 芯片载体后，请参照 [《Stereo-seq 芯片载体保存操作指南》](#) 对产品进行正确地保存。

<https://www.stomics.tech/resources/sop/>

收到产品后

- 请尽快将产品按照指定条件保存。若转移时间较长，建议使用控温容器运输。
- 若发现冷链箱温度异常，可要求物流方现场打印温度实时监控记录表；签收后也可联系当地科研合作代表，以查询相关记录。
- 当运输条件、储存条件及使用方式都正确时，所有组分在有效期内均能保持完整活性。

表格 1-2 Stereo-seq 转录组试剂盒 T 产品组分信息

Stereo-seq 转录组试剂盒 T 货号：401KT13114			
组分信息	货号	管盖颜色	规格及数量
RI	1000028499	● 橙色	300 μL × 1
PR Enzyme	1000028500	● 红色	10 mg × 1
Glycerol	1000047910	● 紫色	100 μL × 1
H&E Mounting Medium*	1000041969	● 紫色	50 μL × 1
RT Buffer Mix	1000047911	○ 透明	731 μL × 1
RT Plus	1000047912	● 黄色	18 μL × 1
RT Oligo	1000047913	○ 透明	44 μL × 1
RT Enzyme Mix	1000047914	○ 透明	88 μL × 1
Elute Additive	1000048030	● 绿色	22 μL × 1
Neutralization Solution	1000047915	● 绿色	102 μL × 1
4× cDNA PCR Mix	1000047916	● 蓝色	337 μL × 1
cDNA Primer	1000047917	● 蓝色	53 μL × 1
🧊 储存温度：－ 25℃ ~ － 15℃ 🚚 运输温度：－ 25℃ ~ － 15℃ ⌚ 有效期：见标签			



* 此试剂用于 H&E 染色封片，若不开展 Stereo-seq 兼容 H&E 染色产品方案，不需要用到此试剂。如需进行 H&E 染色，请按照 [《附录 C 兼容 H&E 染色操作流程》](#) 进行三方试剂准备和实验操作。

表格 1-3 Stereo-seq 芯片 T 载体产品信息

Stereo-seq 芯片 T 载体 (1 cm * 1 cm) -Dual 货号: 400CT13114		
组分信息	货号	规格
Stereo-seq 芯片 T 载体 (1 cm * 1 cm) -Dual	-	4 EA
 储存温度: -25°C ~ -15°C  运输温度: -25°C ~ -15°C  有效期: 见标签		

表格 1-4 时空组学配件套装 -FF V1.3 for Go Spatial 产品信息

时空组学配件套装 -FF V1.3 for Go Spatial 货号: 310AK006		
组分信息	货号	规格
Stereo-seq V3 载具上盖	1000066738	2 PCS
Stereo-seq V3 载具底座	1000066739	2 PCS
Stereo-seq V3 载具垫圈	1000066760	2 PCS
 储存温度: 18°C ~25°C  运输温度: 0°C ~30°C  有效期: 见标签		

1.4. 适配的硬件

适用的硬件: 时空自动化样本处理系统 Go Spatial-V2-24

适用的控制软件的版本号: STOmics 软件 V2.5.0 版本及以上

使用的应用流程: Stereo-seq 转录组试剂套装 V1.3 for Go Spatial (1cm x 1cm)。

1.5. 需搭配的试剂耗材

表格 1-5 需要额外搭配的核心试剂盒信息

应用阶段	试剂	品牌	货号
透化摸索	Stereo-seq 透化试剂套装 V1.1 (载体版)	STOmics	201SP11118
文库构建	Stereo-seq 16 Barcode 建库试剂盒 V1.1	STOmics	101KL11160
测序	DNBSEQ-T7RS 时空可视化试剂套装 *	MGI	940-001895-00

* 仅以 DNBSEQ-T7RS 测序仪配套测序试剂为例, DNBSEQ-T7+RS、DNBSEQ-T1+RS、MGISEQ-2000RS 等测序仪均具备配套时空可视化试剂套装, 如需采购, 请咨询当地销售代表。



表格 1-6 Go Spatial 适配耗材信息

应用阶段	品牌	描述	货号
Go Spatial 耗材上机	MGI	1.3 mL 深孔板	1000004644
		50 mL 试剂槽	012-000780-00
		100 mL 试剂槽（可选）	012-000779-00
		1000 μL 透明吸头	1000023970
		1000 μL 黑色斜口吸头	091-000376-00
		200 μL 透明吸头	091-000158-00
		50 μL 透明吸头	091-000157-00
		5 mL 试剂管	1000002452
		0.5 mL 管盖	1000000981
时空组学配件套装拆卸	STOmics	Stereo-seq V3 载具拆卸工具	303TA30011

1.6. 客户自备物料清单

此清单列出了本实验所需的设备和物料。表格 1-7 不包括标准实验室设备，如制冰机、生物安全柜、pH 计、冰箱等。关于显微镜的要求，请参考《Stereoseq 空间多组学技术成像指南》。

<https://www.stomics.tech/resources/sop>

表格 1-7 客户自备物料清单推荐

仪器		
品牌	描述	产品编号
-	冰冻切片机	-
-	荧光显微镜（拼接功能）	-
-	金属浴（或同等功能仪器）	-
-	烤片机（或同等功能仪器）	-
-	小型离心机	-
-	移液器	-
-	漩涡混匀仪	-
Bio-Rad *	T100™ PCR 仪	1861096
ABI*	ProFlex™ 3 x 32 孔 PCR 系统	4483636
NEB	NEBNext® Magnetic Separation Rack	S1515S
Thermo Fisher	DynaMag-2 磁力架	12321D
	Qubit® 3.0 荧光定量仪	Q33216 (或同等功能仪器)
Agilent Technologies	Agilent 2100 Bioanalyzer	G2939AA (或同等功能仪器)



可从带 * 标记品牌中任选一个使用。

试剂		
品牌	描述	产品编号
-	无水乙醇（分析纯）	-
	Nuclease-Free Water	AM9937
Ambion	1X TE Buffer, pH 8.0	AM9858
	20X SSC	AM9770
Agencourt ¹	AMPure® XP	A63882
Beckman Coulter ¹	SPRIselect	B23317/B23318/ B23319
VAZYME ¹	VAHTS DNA Clean Beads	N411-02
Sigma Aldrich	盐酸	2104-50ML
	甲醇	34860-1L-R
SAKURA ²	SAKURA Tissue-Tek® O.C.T. Compound	4583
BioSharp ²	OCT 冷冻切片包埋剂	BL557A
Aladdin ³	氢氧化钾溶液，8M	P291842
Millipore Sigma ³	Potassium Hydroxide Solution, 8M（氢氧化钾溶液，8M）	P4494-50ML
Invitrogen	Qubit ssDNA Assay Kit	Q10212
	Qubit dsDNA HS Assay Kit	Q32854
Agilent	安捷伦高灵敏度 DNA 分析试剂盒	5067-4626
	安捷伦高灵敏度 RNA 分析试剂盒	5067-1513



从含有相同序号上标的品牌中任选其一。

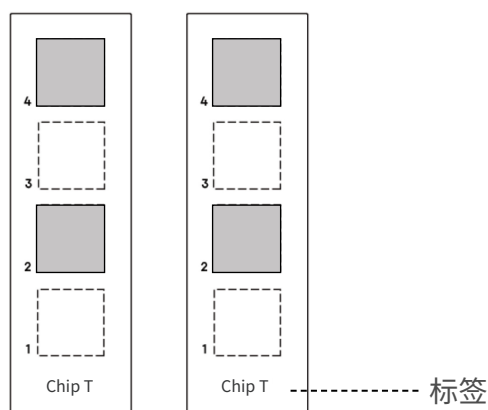
耗材		
品牌	描述	产品编号
-	锡箔纸	-
-	镊子	-
-	载玻片染色架	-
Corning	15 mL 离心管	430791
	50 mL 离心管	430829
-	载玻片（尺寸：25 mm×75 mm）	-
-	显微镜盖玻片（尺寸：18 mm × 18 mm, 厚度：0.13 - 0.16 mm）	-
Kimtech	Kimwipes 无尘纸	34155
MATIN	Power dust remover（空气罐）	M-6318
Invitrogen	Qubit Assay Tubes	Q32856
Axygen	1.5 mL 离心管	MCT-150-A
	1,000 μL 带滤芯枪头	TF-1000-L-R-S
	200 μL 带滤芯枪头	TF-200-L-R-S
	100 μL 带滤芯枪头	TF-100-R-S
	10 μL 带滤芯枪头	TXLF-10-L-R-S
	96 孔板	PCR-96M2-HS-C
	PCR 八连管 ¹	PCR-0208-CP-C
	0.2 mL PCR 管 ¹	PCR-02-C
PARAFILM	封口膜	PM996



从含有相同序号上标的品牌中任选其一。

1.7. Stereo-seq 芯片 T 载体介绍

Stereo-seq 芯片 T 载体 (1cm*1cm) -Dual 包含 2 个载体，每个载体上均贴有 2 张 Stereo-seq 芯片 T，芯片尺寸为 1cm*1cm。以下为 Stereo-seq 芯片 T 载体 (1cm*1cm) -Dual 的示例图：



Stereo-seq 芯片 (T) 载体保存方法

Stereo-seq 芯片 T 载体装于真空密封的铝袋中，冷链运输。收到产品后须立即将未开封的 Stereo-seq 芯片 T 载体储存在 $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ 。若拆袋后未使用，需重新干燥密封并储存在 $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ 。



 需在铝制密封袋中放入干燥剂以保持干燥条件。重新密封的芯片不可放置超过两周。



时空组学配件套装 -FF V1.3 for Go Spatial 介绍

时空组学配件套装 -FF V1.3 for Go Spatial 中包含 Stereo-seq V3 载具上盖、Stereo-seq V3 载具底座及可装卸的 Stereo-seq V3 载具垫圈。使用前需要进行组装。

有关时空组学配件套装的组装和拆卸演示视频，请参阅以下链接或扫描二维码：

<https://www.stomics.tech/resources/Videos/3671.html>。

可参考 [《Stereo-seq V3 载具使用说明书》](#)

<https://www.stomics.tech/resources/Documents/list.html>。

1.8. 注意事项

- 本产品仅适用于科研用途，不可用于临床诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
- 实验前请熟悉需使用的各种仪器的注意事项并掌握其操作方法。
- 本说明书提供的实验流程是通用的，实际操作中可根据具体的实验设计、样本特征、测序应用和设备进行实验流程、反应参数的调整，以优化性能和效率。
- 推荐使用前将各试剂组分提前取出，将酶类组分瞬时离心后置于冰上备用，并将其他组分置于室温解冻。解冻后轻柔地上下颠倒数次使其充分混匀，瞬时离心后置于冰上备用。
- 为避免样本交叉污染，推荐使用带滤芯的吸头，吸取不同样本时请更换吸头。
- 应避免皮肤和眼睛直接接触样本及试剂，切勿吞咽样本及试剂，一旦发生意外请立即用大量清水冲洗并及时就医。
- 首次运行该应用前，请确认 Go Spatial-V2-24 已经导入正确的控制软件版本号和应用流程。
- 在每次实验前后，请参照本使用说明书的 3.7.10 章节进行清洁。
- 所有样本和各种废弃物均应按相关法规规定处理。

第二章 样本准备



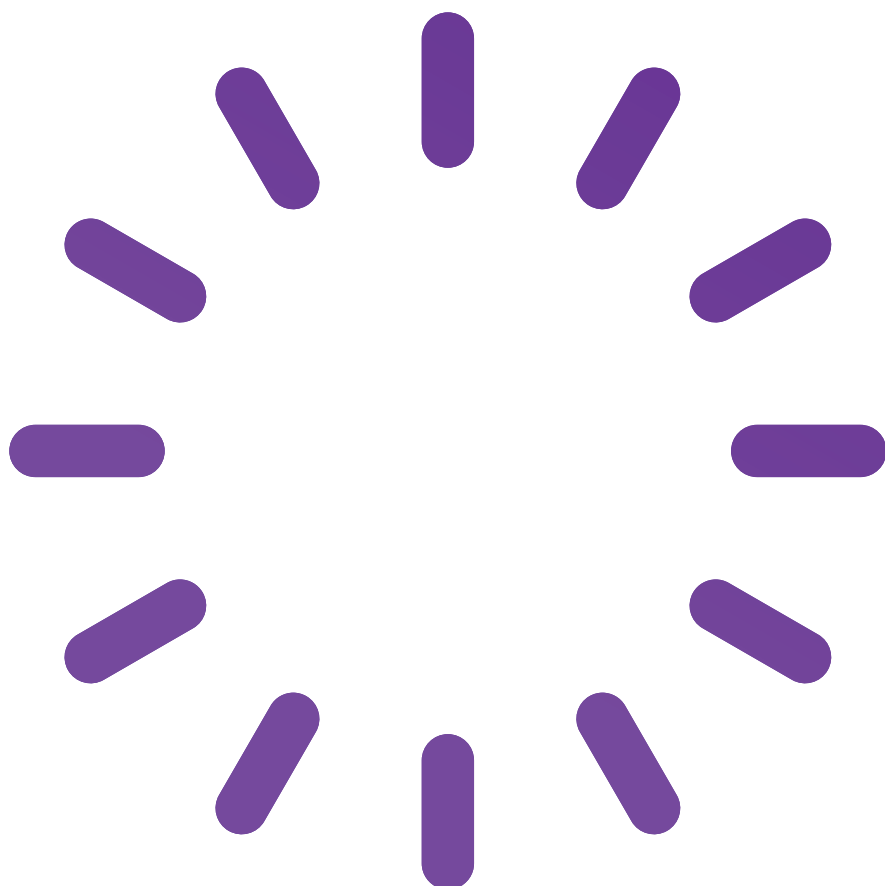
请参照 [《时空实验 FF 样本准备操作指南》](#) 进行样本准备。



 建议对 $RIN \geq 4$ 的样本进行后续实验。

第三章

Go Spatial 时空转录组 FF V1.3 转录组实验标准操作流程



3.1. 实验前准备



本实验用于稀释试剂的液体，除特殊说明外，均使用 **Nuclease - Free Water**。



Go Spatial 运行所需的试剂配制及准备细节，详见 3.7.3 章节。

第一天

准备试剂	准备流程	暂存条件
5X SSC	取 20X SSC 5 mL 稀释到 20 mL	室温
甲醇	提前 - 20°C 中预冷	- 20°C
0.1X SSC	取 20X SSC 200 μ L 稀释到 40 mL，上机前装在一个干净的 50 mL 试剂槽中	室温
Wash Buffer	取 10 μ L RI 加入 190 μ L 0.1X SSC 中，用于一张芯片载体 (1 cm * 1 cm) - Dual，每张芯片用量至少为 100 μ L	冰上备用
0.01N HCl	按照 HCl 浓度梯度稀释到 0.01N，pH 值准确到 2.0（确保 pH 值在 1.9 - 2.1 范围内；至少 4 mL/4 芯片），上机前分装到 5mL 空管（MGI, Cat. No. 1000002452）中，具体用量配制请参考 3.7.3 章节的试剂准备及说明	室温 48 hr
0.01N HCl 需现配现用。对于预制的 0.1N HCl 和新购买的 HCl，实验前请检查 pH 值。 储存时间超过 48 hr 将影响预期 pH 值，请在配制后 48 hr 内使用。		
0.1M KOH	取 45 μ L 8M KOH 稀释到 3.6 mL，可满足 2-12 张芯片的用量，上机前分装到 5mL 空管（MGI, Cat. No. 1000002452）中。具体用量配制请参考 3.7.3 章节的试剂准备及说明	室温 48 hr
0.1M KOH 需现配现用。对于新购买的 KOH，实验前请检查 pH 值（稀释到 1M，pH 值为 14 ± 0.3 ）。 储存时间超过 48 hr 将影响预期 pH 值，请在配制后 48 hr 内使用。		
Glycerol	使用前，至少提前 5 min 取出，平衡至室温	室温
Neutralization Solution	提前 5 min 取出放于常温备用，每张芯片用量 23 μ L	室温
80% 乙醇	无水乙醇稀释到 80%	室温 1 天
磁珠	提前取出，室温放置 30 min 平衡	37°C 平衡后室温放置

准备仪器	设置程序	备注
冷冻切片机	箱体预冷至 -20°C ，样本头预冷至 $-15^{\circ}\text{C} \sim -10^{\circ}\text{C}$	温度根据实际操作过程调整
烤片机	37°C ，用于贴片后烤片	检查设备是否有异常，必要时更换
PCR 仪	95°C Hold, 用于变性（热盖 105°C ）； 95°C 、 98°C 、 58°C 、 72°C 反应温度用于PCR 扩增程序（ 105°C 热盖）	检查设备是否有异常，必要时更换
Go Spatial	-	组织固定期间开机，进行预降温
荧光显微镜	FITC 通道（荧光染色）	检查显微镜是否有异常，必要时更换

3.2. 切片准备

- a. 提前将烤片机温度设置到 37°C（或用 PCR 仪适配 PCR 适配器替代）；
- b. 冷冻切片机箱体预冷至 - 20° C，样本头预冷至 - 15° C ~ - 10° C（根据实际操作过程调整）；



⋯ 样本头温度过低会导致切片出现裂纹，样本头温度过高会导致切片出现褶皱，请根据样本情况将冻头调整到合适温度。

- c. 提前将毛刷、刀片和镊子等置于箱体预冷；
- d. 将 OCT 包埋的组织块从 - 80° C 冰箱取出，放在冷冻切片机内平衡 **30 min**；
- e. 使用 OCT 将组织块固定到样品托上；
- f. 将组织块修剪成合适的尺寸（针对 1cm*1cm 芯片：切面小于 0.9 cm × 0.9 cm），切去组织块周围过多的 OCT，保留一部分 OCT，方便转移组织；
- g. 根据需要对组织块做最后地修剪，以确保组织切片能更好地适配芯片，随后可进行冷冻切片。

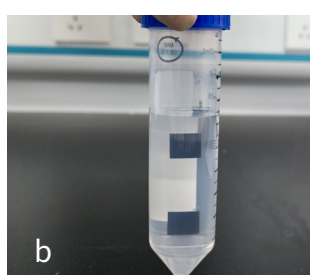
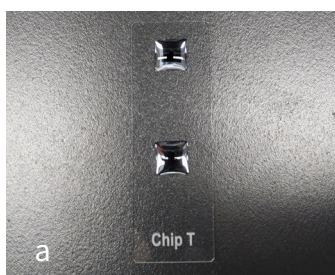
3.3. 芯片处理与组织贴片

- a. 取芯片：从真空干燥铝箔袋中取出 Stereo-seq 芯片 T 载体 Dual，记录芯片背面的编号；注意不要触碰芯片正面；



- 打开后，请检查玻片盒中的所有的 Stereo-seq 芯片载体是否正确定位在插槽中，载体上的芯片是否正面朝上。芯片的正面为亮光面，正面含有用于 mRNA 捕获的探针。请勿触碰到芯片表面。

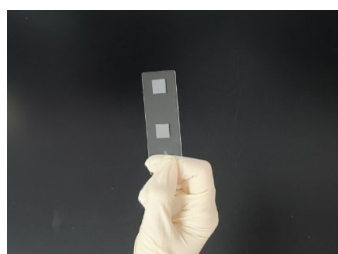
- b. 将载体置于桌面上复温 **1 min**，观察芯片表面是否有杂质，如芯片上存在杂质，使用 100 μ L Nuclease-Free Water 清洗 2 次，可参考图 a；或在含 40-50 mL Nuclease-Free Water 的离心管中清洗 2 次，可参考图 b；



- c. 清洗后用气瓶吹干芯片四周及表面，再用无尘纸吸干载玻片背面和周围多余的液体；



- d. 当芯片表面无杂质、无明显痕迹、无任何液体残留、无波纹状纹理，即可准备贴片；

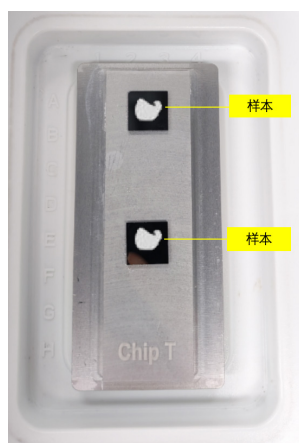


- e. 预冷甲醇：在玻片盒或 50 mL 离心管中加入足量甲醇，确保甲醇足够浸没所有芯片（可将一张普通载玻片放入容器中，查看甲醇的体积是否足够）。扣紧盖子，提前放入切片机中（ -20°C ）预冷 **5-30 min**；

- f. 将组织包埋块固定至冻头上，修片；
- g. 组织贴片有两种操作方式可选：热贴（A）和冷贴（B）。根据需求选择切片厚度，通常为 10 μm 。

A. 热贴

- 1) 连续切取组织切片，将切片移到切片台右侧靠近边缘处，然后用预冷的毛刷轻轻拨动切片周围的 OCT 使切片铺平，每张切片放置间隔距离大于载体宽度，以免贴片时粘连相邻切片；
- 2) 拿起载体的一边，使芯片正面朝下，对准切片；
- 3) 轻轻一压，肉眼可见切片已经吸附到芯片表面；
- 4) 重复 2) -3) 步骤操作，直至全部组织切片吸附到芯片表面（贴片时间控制在 1 min 以内）；
- 5) 将芯片正面朝上，快速将载体置于提前预热至 37° C 的烤片机上，孵育 5 min，无需盖 PCR 热盖。



B. 冷贴

- 1) 将玻片正面朝上置于切片机中，预冷 1-6 min；

⋯ 预冷时间不可过长，以免玻片表面产生水雾；预冷时间不可太短，以免玻片无法达到预冷温度。

- 2) 进行冷冻切片，然后用预冷的毛刷轻轻拨动切片周围的 OCT 使切片铺平。用镊子和毛刷将切片小心覆盖在芯片正中央并铺平，注意毛刷不要触碰到组织。尽量一次贴片成功，确保组织切片完整，无褶皱；

- 3) 立即拿起芯片载体，用指腹放在载体背面加温几秒钟，直至切片贴合；

- 4) 重复上述操作，直至所有切片贴片完成，建议组织切片贴片控制在 5 min 内；

- 5) 快速将载体置于烤片机上 37°C 孵育 5 min，无需盖 PCR 热盖。

⋯ 进行冷贴时需控制好每张切片贴片时间，间隔时间太大，组织贴片会皱缩。



针对一张玻片两张芯片贴不同组织的注意事项：

贴片场景一：两张芯片贴片间隔不超过 2 min（适用于一台切片机准备同个样本连续切片的应用场景）

同时切出两张目标组织切面，依次在芯片载体的两张芯片上完成贴片后，整体进行 37° C 孵育 5 min。

贴片场景二：两张芯片贴片间隔在 2 - 10 min 范围内（适用于两台切片机同时准备切片的应用场景）

第一张芯片贴片完成后，快速将芯片载体放置于 37° C 孵育 2 - 5 min，孵育后取出常温备用；孵育期间，同时准备第二个组织的目标切面；待第一次孵育结束，尽快完成第二张芯片贴片，随后快速转移至 37° C 孵育 5 min。

贴片场景三：两个芯片贴片间隔长（适用于一台切片机分批准备切片的应用场景）

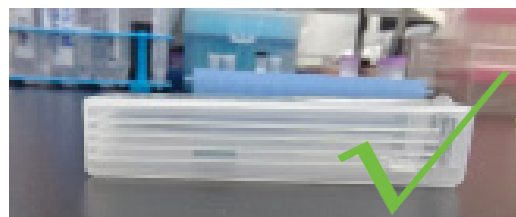
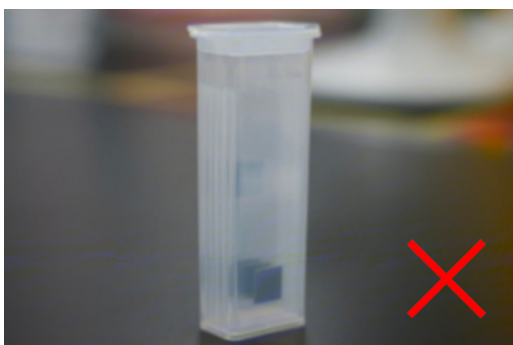
第一张芯片贴片完成后，快速放置于 37° C 孵育 5 min；随后密封干燥存好，立即用干冰转移到 - 80° C 冰箱暂存；在第二张芯片贴片前，从冰箱取出载体，用干冰转移后置于 37° C 孵育 2 - 5 min；孵育完成后，进行第二张芯片贴片；最后再次 37° C 孵育 5 min。



- （可选暂停点）将孵育好的芯片载体放于玻片盒或者 50 mL 离心管，然后将其放入可密封的塑料袋中，同时放入干燥剂包，尽可能多地挤出空气并将塑料袋密封。用干冰快速转移到 - 80° C 冰箱，最长可于 - 80° C 保存一个月。继续实验时，使用干冰将玻片盒或者 50 mL 离心管转移，取出贴有组织的芯片载体，快速置于烤片机上 37° C 孵育 5 min。



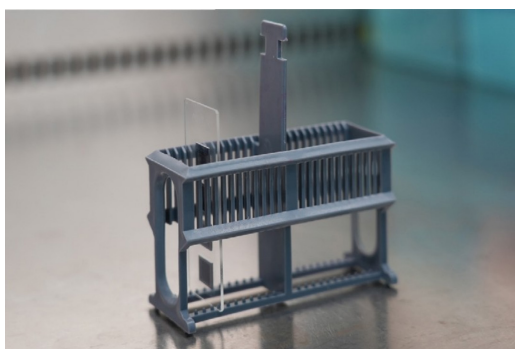
- 芯片转移到 - 80° C 冰箱冻存的时候，需要水平放置玻片盒（组织贴片面朝上）。继续实验时，请先观察芯片是否松动。请谨慎使用此暂停点。



- 对于多板上样即上满 12 张通量的芯片，建议提前一天贴片，并用干冰快速转移至 - 80° C 保存，次日进行后续烤片、固定、拍照等操作。

3.4. 组织固定

- a. 孵育结束后，立即将芯片载体置于 -20°C 预冷的甲醇中，确保甲醇浸没载体上的所有芯片，固定 **30 min**（固定时间最长不超过 **1 hr**）；
- b. 组织固定期间进行 Go Spatial 开机及预降温操作（见“**3.7.2 Go Spatial 仪器准备**”），并可根据上样模式按照 **3.7.3** 到 **3.7.4** 章节内容准备 Go Spatial 所用试剂耗材；
- c. 将载体从玻片盒或 50 mL 离心管中取出，用无尘纸吸干载玻片背面和周围多余的甲醇，确保无液体残留；
- d. 将载体竖立放在载玻片染色架上，置于通风橱中晾干 **4-6 min**，让甲醇充分挥发；晾干期间请根据芯片数量按照表格 3-1 配制组织荧光染色液；



- e. 甲醇挥发完全后，肉眼可见组织变白，将载体转移至实验台上进行下一步。

3.5. 荧光染色



- a. 将提前配制的组织荧光染色液加到芯片上,1 cm*1 cm 芯片的用量为 **100 μL/ 芯片**。先在芯片的每个角加入一滴染色液,然后将其余染色液加到芯片中央,使所有染色液融合,确保染色液均匀覆盖全芯片,室温避光染色 **5 min**;

⋯ 提前将 Glycerol 置于室温平衡 5 min。

表格 3-1 组织荧光染色液

组分	2X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
5X SSC	207.9	415.8
Qubit ssDNA Reagent	1.1	2.2
RI	11	22
Total	220	440

- b. 染色期间配制 Wash Buffer。1 cm*1 cm 芯片的用量为 **100 μL/ 芯片** ;
- c. 倾斜载体,用移液器从芯片一角吸去组织荧光染色液,尽量减少表面液体;
- d. 向芯片加入 Wash Buffer,1 cm*1 cm 芯片的用量为 **100 μL/ 芯片** ;
- e. 倾斜载体,用移液器从芯片一角吸弃 Wash Buffer,尽量减少表面液体;
- f. 将载体转移至无尘纸上,一手固定载体,另一手持空气罐,出气口距离芯片一角 2-3 cm 位置,以大概 30°倾角缓慢吹气,从芯片角落起始顺序推进,吹干芯片表面液体,勿使气流过猛;

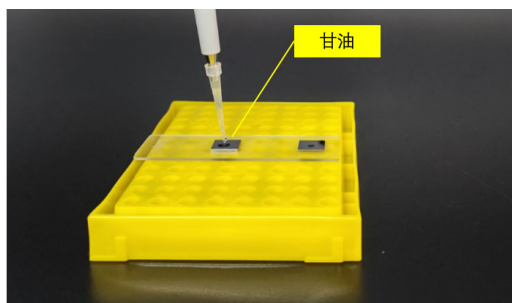


- g. (可选操作) 使用载玻片离心机 (微型玻片离心机 LX-700) 离心 **10 s** 甩干芯片上液体;



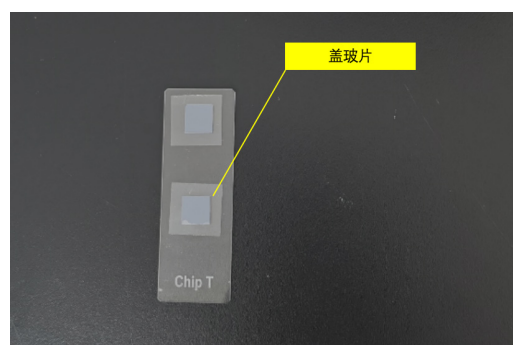
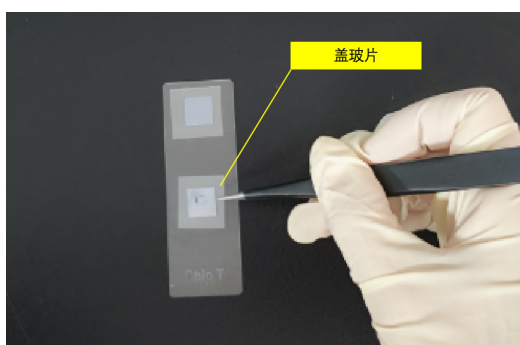
- ⋯ 确保芯片上没有残留的染色液。
- ⋯ 确保已将 Glycerol 提前置于室温平衡 5 min。

- h. Glycerol 使用前离心，确保甘油中无气泡，用移液器缓慢吸取 5 μ L Glycerol 甘油滴加到组织中央，避免产生气泡；



⋯ 请保证盖玻片使用前干净无灰尘，可使用酒精擦拭盖玻片表面或者使用空气罐吹干净。

- i. 用镊子夹取盖玻片，小心将盖玻片的一端放在芯片边上，同时握住另一端，然后逐渐将盖玻片放低到芯片上直至完全覆盖芯片；待甘油浸润整张芯片后，立即拍照，避免荧光淬灭。



3.6. 荧光拍照

成像过程需要保证染色通道的 Track 线和组织区域同时清晰且组织区域不过曝。



a. 在显微镜控制软件中新建文件夹，以芯片号命名，也可适当注明其他相关信息；



文件夹名称只使用字母、数字、下划线，禁止使用空格等特殊字符。

例：B00249A1

b. 在载物台上滴加 1-2 μL 水，将 Stereo-seq 芯片载体转移到显微镜载物台上。选择落射荧光扫描模式，FITC 通道，10 倍镜；



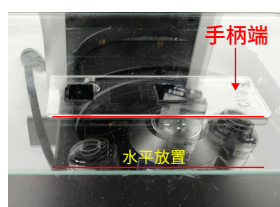
c. 载玻片轻放在载物台上，尽量与载物台平行；



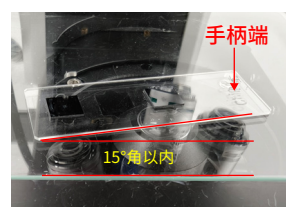
要求芯片边缘水平角度小于 15° ，芯片位置 chip T 手柄始终在右侧。



芯片位置图（背面）：芯片号在上，二维码在下



芯片位置图（正面）：手柄在右侧



d. 打开荧光显微镜，选择落射荧光模式（FITC 通道 (ssDNA)）；

e. 确定组织位置：选择 4X 物镜，将视野移动至芯片上的组织区域，调整亮度、增益和曝光，调节焦距，直至视野内组织和细胞呈清晰状态（光强应保持在较低范围内，以防荧光淬灭）；

f. 扫描地图：框选芯片区域，要求芯片完全在框选区域内且框选区域略微大于芯片，在 4X 物镜下扫描地图，以便确定正式扫描区域；



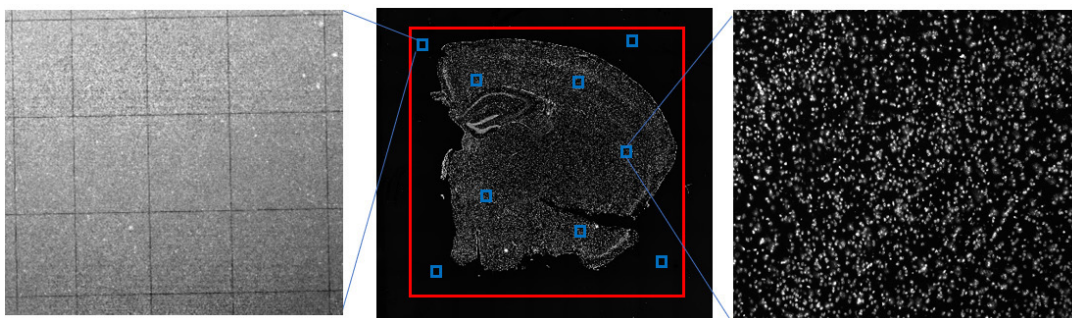
如果显微镜无扫描地图功能，直接跳过该步骤。

g. 调整显微镜倍数：将物镜调整至 10X，进一步调整框选区域，需确保芯片四个角在框选范围内，并尽量与芯片边缘重合；

h. 焦面确定：调节焦距，直至视野内组织和细胞呈清晰状态；

- i. 对焦策略：将视野移至芯片空白区域，微调亮度 / 曝光和焦距，直至芯片上的 Track 线清晰，在芯片不同的空白区域（建议在芯片四个角）建立 3-5 个建模点；将视野移至组织区域，调整亮度 / 曝光和焦距，直至组织和细胞呈清晰状态且不过曝，选择组织中较关注的区域，设置建模点（建议组织区域内每平方厘米选择 3-5 个建模点，如果组织起伏较大，可以酌情增加建模点）；

对于仅支持自动对焦策略的显微镜无需考虑本策略。



- j. 最终成像：完成建模后，将增益调至最小，随即进行扫描；拍照完成后，保存整个文件夹；
- k. 打开 “StereoMap->Tools->imageQC” 模块，拖入 ssDNA 染色图，并参考软件内置的《**StereoMap 用户手册**》来进行图像质控；

更为详细的注意事项请参考 [《Stereo-seq 空间多组学技术成像指南》](#)。



获得的 ssDNA 染色图需要 Track 线质控通过才能自动化进行后续的数据分析（如，自动配准）。



如果 QC 失败，请仔细检查图像清晰度，调整拍照方法进行二次拍照以确保可以获得清晰的组织及 Track 线图像。若二次拍照 QC 仍失败，可以继续实验，实验结束可联系 FAS 帮助排查问题，或借助 StereoMap 进行手动图像处理。



拍照完成后，甘油封片的组织在常温最长可以存放 2 hr，针对 RNA 容易降解的组织，如胰腺，立即进行后续操作以避免 RNA 降解。

3.7. Go Spatial 流程运行

3.7.1. Go Spatial 功能区介绍

设备台面分为吸头载架区, 上料区, 低温产物回收区, 低温试剂区, 常温试剂区, 反应区, 图 3-1 为设备台面示意图;



图 3.1 设备台面平面示意图

- 1) 吸头载架区**：用于放置自动化实验过程中使用的吸头耗材，一共四种：1000 μL 平口透明吸头，1000 μL 斜口黑色吸头，200 μL 透明吸头，50 μL 透明吸头；**请注意，每次上样前吸头需保持插满状态；**
- 2) 上料区 A/B/C**：“Stereo-seq 转录组试剂套装 V1.3 for Go Spatial (1cm x 1cm)” 流程支持在 3 个上料区 C、B、A 上样，各上料区均可放置 2 个载体，每个载体贴有 2 张芯片（处于 2 号和 4 号位），可实现的最大通量为 12 张芯片 / 轮；实验时，上料区 C、B、A 中对应 I 位或 II 位的载体，将分别被转移至反应模块 C、B、A 中对应 I 位或 II 位的区域进行反应，例如：上料区 C- I 位置的载体会被转移至反应模块 C- I 区域进行后续实验操作；
- 3) 低温产物回收区**：用于放置 1.3 mL 96 孔深孔板，每轮流程运行产出的 cDNA 产物会回收该区域；
- 4) 低温试剂区**：用于放置实验流程中使用到、并需要在低温保存的试剂，可放置 0.5 mL/1.5 mL/2 mL 试剂管（1、2、3 列），5 mL 试剂管（4、5、6 列）以及 8 连管（7、8 列），具体试剂摆放位置参考图 3-1 中的低温试剂区放大图；
- 5) 常温试剂区**：用于放置实验流程中使用到、并需要在常温保存的试剂，可支持放置 2 种耗材，分别为 50 mL 试剂槽（1、2、3 列）和 5 mL 试剂管（4、5、6 列）具体试剂摆放位置参考图 3-1 中的常温试剂区放大图；
- 6) 反应模块 A/B/C**：“Stereo-seq 转录组试剂套装 V1.3 for Go Spatial (1cm x 1 cm)” 流程支持在 3 个反应模块 C、B、A 进行生化实验，每个反应区支持放置 2 个载体，反应区载体和上料区载体位置一一对应。

3.7.2. Go Spatial 仪器准备



- 正式上机前，需要预留 30 - 60 min，进行开机、预冷（10 - 20 min）、上机前的清洁消毒（可参考 3.7.10 章节）、实验耗材准备，实验试剂准备等工作，建议组织固定前开始进行上述操作。
 - 仪器启动：开启所有硬件设施，包括：Go Spatial 主机、电控箱、接通外置扫码器、电脑主机与显示器。等待 **1 min** 左右，让硬件部件之间联上通讯；
 - 软件开启：在电脑桌面双击 Go Spatial 运行软件快捷方式“STOmics”，打开操作软件，输入用户名“user”，密码为“123456”，如图 3-2 及 3-3 所示；
- 使用前请确保已安装 STOmics 软件 V2.5.0 版本或以上。软件版本号可通过 STOmics 软件登录界面中的正中下方的文字查阅。



图 3-2 STOmics 软件图标

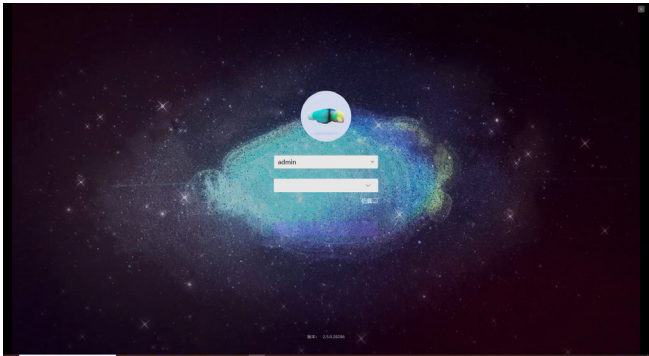


图 3-3 STOmics 软件登录界面

- 仪器初始化：打开软件后，请点击“仪器初始化”按钮进行系统自检，此过程预计为 **1-2 min**，界面如图 3-4 所示；

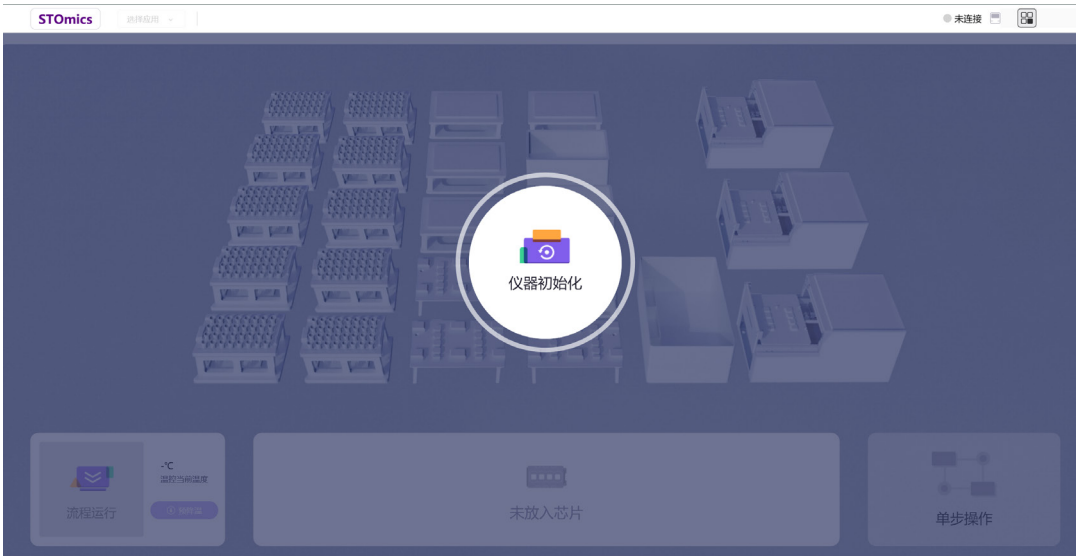


图 3-4 STOmics 软件仪器初始化界面

- d. 选择运行流程: 点击软件界面左上方的”请选择应用“下拉菜单, 选择“Stereo-seq 转录组试剂套装 V1.3 for Go Spatial(1cm x 1cm)” 并点击确定, 界面如图 3-5 所示;

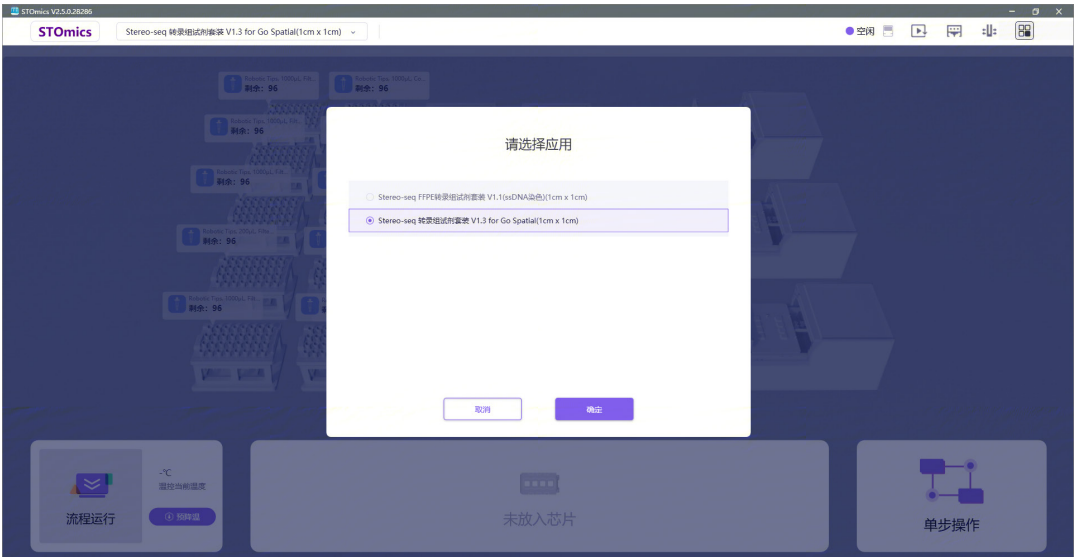


图 3-5 STOmics 软件应用流程选择

- e. 预冷低温试剂区: 点击软件界面左下方的“预降温”界面如图 3-6 所示, 使低温试剂区温度降至 4℃, 降温过程约 10 - 20 min。



- ⚠ 低温试剂区的温度需要稳定降低到 4℃及以下, 才可以点击下一步按钮开始实验流程。
- ⚠ 需要低温试剂区温度稳定在 4℃及以下, 才可以放置低温保存的试剂。



图 3-6 预降温按钮



图 3-7 预降温进行中

3.7.3. 上机试剂准备

实验试剂的准备与芯片数量及上料区位置相关：芯片数量决定了需要在多少个上料区进行上样，上料区位置决定了实验试剂摆放位置。以下章节按照单模块上样及多模块上样两种应用类型介绍，请根据实际操作场景参考对应章节内容。

一. 实验试剂位置说明

A. 单模块上样：单次流程运行仅使用一个反应模块

a. 仅使用反应模块 C：请参考图 3-8 放置低温试剂和常温试剂；

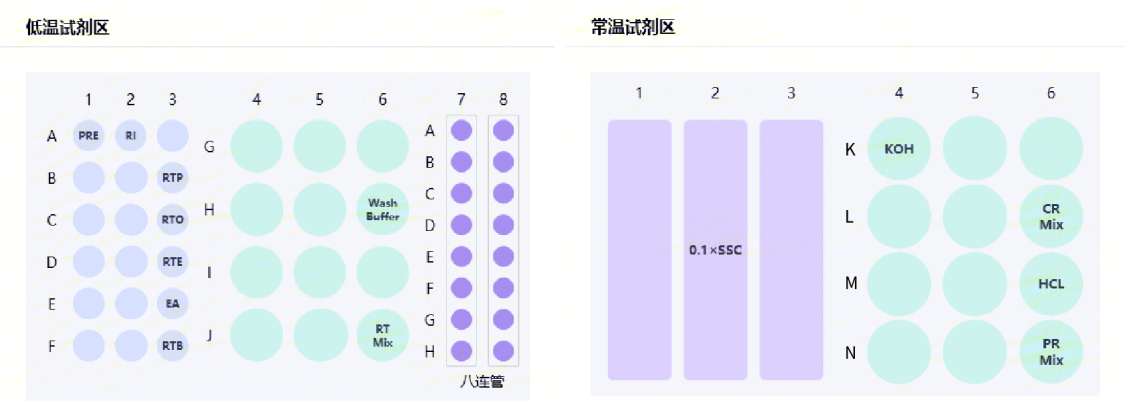


图 3-8 低温试剂区及常温试剂区台面放置示意图 - 反应模块 C

b. 仅使用反应模块 B：请参考图 3-9 放置低温试剂和常温试剂；



图 3-9 低温试剂区及常温试剂区台面放置示意图 - 反应模块 B

c. 仅使用反应模块 A：请参考图 3-10 放置低温试剂和常温试剂。



图 3-10 低温试剂区及常温试剂区台面放置示意图 - 反应模块 A

B. 多模块上样：单次流程运行使用多个反应模块

Go Spatial-V2-24 适配 FF 转录组 V1.3 应用，采取模块化分时上样模式，推荐按照“上料区 C → 上料区 B → 上料区 A”的顺序进行多模块上样。根据实验的样本数量、不同的透化时间，一次性将所有芯片需要的试剂准备好，在第一个模块的芯片上料时，将所有芯片需要的试剂按照实际情况，参考如下 Go Spatial 台面所示（图 3-11 & 3-12），打开管盖并摆放好。使用 2 个反应模块（C&B）：请参考图 3-11 放置低温试剂和常温试剂；使用 3 个反应模块（C&B&A）：请参考图 3-12 放置低温试剂和常温试剂。

a. 仅使用 C 和 B 反应模块：请参考图 3-11 放置低温试剂和常温试剂；

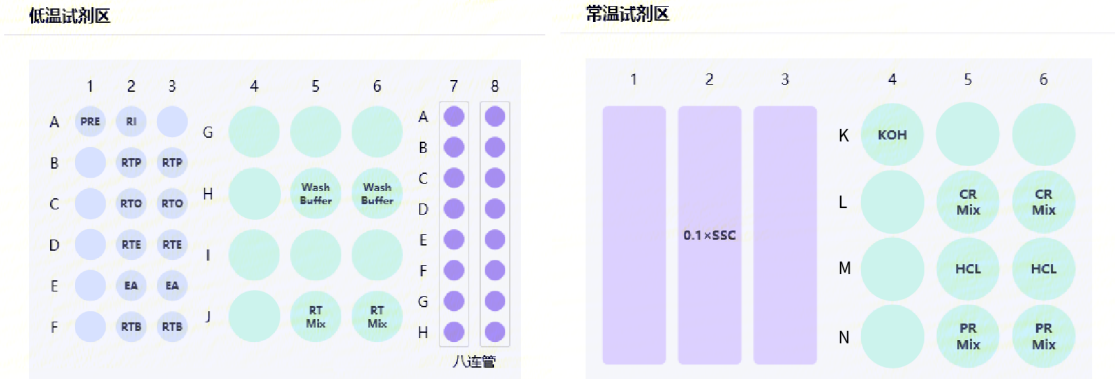


图 3-11 仅 C、B 两个反应模块使用时，低温试剂 & 常温试剂区的试剂及耗材放置示意图

b. 使用 3 个反应模块：请参考图 3-12 放置低温试剂和常温试剂。

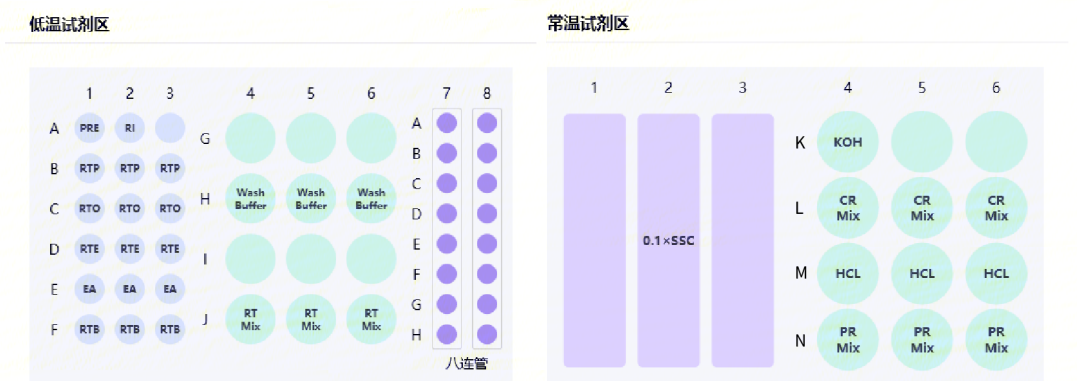


图 3-12 C、B、A 三个反应模块均使用时，低温试剂 & 常温试剂区的试剂及耗材放置示意图

二. 试剂准备

流程使用到的试剂分为 **a. 多模块共用试剂**，及 **b. 单模块专用试剂**：

- a. 多模块共用试剂：** 根据单次运行所需的试剂用量，全流程只需准备 1 份试剂，即可满足多个反应模块的使用需求。
- b. 单模块专用试剂：** 除了多模块共用试剂，其他试剂需单独为每个反应模块提供专用试剂，单个试剂盒最多可支持一个反应模块的 4 张芯片的用量。专用试剂取用及放置规则如下：

反应模块 C： 取用低温试剂区第 3 列、第 6 列和常温试剂区第 6 列的模块 C 专用试剂；
反应模块 B： 取用低温试剂区第 2 列、第 5 列和常温试剂区第 5 列的模块 B 专用试剂；
反应模块 A： 取用低温试剂区第 1 列、第 4 列和常温试剂区第 4 列的模块 A 专用试剂。
参考表格 3-2，根据单次运行所需处理的芯片数量准备对应的数量及体积的试剂。

表格 3-2 Go Spatial 时空转录组 FF V1.3 转录组上机前准备对照表

孔位编号 *	台面代号	试剂名称	上机前准备及提示
低温试剂区 - 小管			
A1	PRE	PR Enzyme	原管上机，干粉，4℃暂存，上机前瞬时离心，确保粉末聚集于管底，多模块共用
A2	RI	RI	原管上机，4℃暂存，上机前瞬时离心，多模块共用
B1/B2/B3	RTP	RT Plus	解冻后原管上机，4℃暂存，上机前瞬时离心
C1/C2/C3	RTO	RT Oligo	解冻后原管上机，4℃暂存，上机前瞬时离心
D1/D2/D3	RTE	RT Enzyme Mix	原管上机，4℃暂存，上机前瞬时离心
E1/E2/E3	EA	Elute Additive	原管上机，4℃暂存，上机前瞬时离心
F1/F2/F3	RTB	RT Buffer Mix	解冻后原管上机，4℃暂存，上机前瞬时离心

孔位编号 *	台面代号	试剂名称	上机前准备及提示
低温试剂区 - 大管			
H4/H5/H6	Wash Buffer	Wash Buffer	5 mL 空管
J4/J5/J6	RT Mix	RT Mix	5 mL 空管
常温试剂区			
K4	KOH	0.1M KOH	自备试剂，现配现用，转移至干净的 5 mL 空管后上机前室温暂存，多模块共用
L4/L5/L6	CR Mix	cDNA Release Mix	5 mL 空管
M4/M5/M6	HCl	0.01N HCl	自备试剂，现配现用，转移至干净的 5 mL 空管后上机前室温暂存
N4/N5/N6	PR Mix	PR Mix	5 mL 空管
单孔槽 2	0.1X SSC	0.1X SSC	自备试剂，多模块共用

 * 孔位编号，参考图 3-8 至 3-12 的台面示意图中的编号。

试剂准备说明：

- 
- 1) 试剂盒中的 PR Enzyme 为透化酶干粉，所有反应模块只需 1 管透化酶干粉（多模块共用试剂）。在放置进仪器前请瞬时离心，离心后观察粉末位置。若有粉末聚集管壁，请拧紧上盖后，在桌面轻敲几下管体，保证干粉处于管底；

 若使用先前运行剩余的 10X 透化酶母液，先将剩余试剂从 -20℃ 取出放在冰上化冻，再瞬时离心后上机。该操作仅适合同一试剂盒分成 2 次单载体上机使用的场景（每次运行只有 1 张载体，2 张芯片，详情请参考附录 A）；多模块运行的使用场景下，需使用试剂盒内一管全新的、未开封的透化酶干粉。

2) 多模块运行时，RI 试剂需要使用试剂盒中一管全新的、未开封的试剂；

3) 自配试剂 0.1M KOH，需要现配，该试剂为多模块共用试剂。转移至干净的 5 mL 空管后，上机前可室温暂存，试剂用量与芯片数量相关，详细见下表；

芯片数量	2 张芯片	4 张芯片	6 张芯片	8 张芯片	10 张芯片	12 张芯片
0.1M KOH 用量	1.2 mL	1.6 mL	2.0 mL	2.4 mL	2.8 mL	3.6 mL

- 4) 自配试剂 0.01N HCl，需要现配。制备完成后，转移至一个新的 5 mL 空管中。该试剂为独立模块试剂，每增加一个反应模块，按照芯片数量增加一管试剂用量。摆放的孔位需与反应模块对应。试剂用量与芯片数量相关，详细见下表；

芯片数量	2 张芯片	4 张芯片
0.1M KOH 用量	3 mL	4 mL

- 5) 常温试剂区左侧中间编号为 2 的位置放置 0.1X SSC，该试剂为多模块共用试剂。
在 50 mL 试剂槽中加入 20 mL 的自配试剂 0.1X SSC；



先将干净的 50 mL 试剂槽平稳放置在仪器中后再倒入配制好的 0.1X SSC，以防固定试剂槽的时候导致液体溅出。

- 6) 自配试剂 0.1M KOH、0.01N HCl、0.1X SSC 试剂放置前请确保混匀；
7) 不建议将套装内试剂分装使用，容易导致试剂冗余不足，影响实验流程。

试剂上机前注意事项：

- 1) 低温试剂（试剂孔位编号 A-J）需要设备的低温试剂区降至 4°C 及以下后才可放置，且放置前需确保试剂充分解冻并瞬时离心；
- 2) 试剂摆放一定要注意将试剂完全放置到孔位中，可以在放置到对应孔位后，轻轻压下试剂管边缘保证试剂管触底，即为正确放置；
- 3) 所有试剂均需揭盖敞口放置上机；
- 4) 建议全流程开始将所有模块需要的试剂放置于机舱内，避免在多模块上样窗口期开放时放置试剂，以防操作失误导致仪器中途报错或试剂不足导致实验结果不佳。

3.7.4. 上机耗材准备

- a. 按表格 3-3 进行实验耗材的准备，如需了解详细吸头使用数量请参考《附录 B: Go Spatial 时空转录组 FF V1.3 吸头使用数量参考》；

表格 3-3 Go Spatial 时空转录组 FF V1.3 物料耗材使用明细表

芯片数量	1000 μ L 透明吸头	1000 μ L 黑色斜口吸头	200 μ L 吸头	50 μ L 吸头	96 孔深孔板	5 mL 试剂管 (含试剂)	5 mL 试剂空管 (无试剂)	50 mL 试剂槽	100 mL 废液槽
2/4	1 盒	1 盒	1 盒	1 盒	1 个	2 个	4 个	1 个	1 个
6/8	1 盒	1 盒	1 盒	1 盒	1 个	3 个	8 个	1 个	1 个
10/12	1 盒	1 盒	1 盒	1 盒	1 个	4 个	12 个	1 个	1 个

- b. 按照图 3-13 放置耗材：
- 1) 表格 3-3 中 4 种吸头按照图 3-13 标识放置到对应吸头载架区；
 - 2) 表格 3-3 中 96 孔深孔板按照图 3-13 标识放置到“1.3 mL 96 孔深孔板”区；
 - 3) 表格 3-3 中 50 mL 试剂槽，100 mL 废液槽按照图 3-13 标识放置到对应区；
 - 4) 表格 3-3 中 5 mL 空管，参考表格 3-2 和 3.7.3 章节的信息放置到对应试剂区。



图 3-13 耗材放置示意图

耗材放置注意事项：

- 1) 吸头放置：每次实验前，应始终使用满载的吸头盒，以确保在设备自动化工作中，有足够的吸头可以使用，避免因吸头不足导致的实验失败；吸头盒放置的时候，保持 A1 位于左上角的方向，枪头板椭圆形缺口与吸头架左上侧靠齐；

- 2) 深孔板放置：每次实验前，先打开深孔板的盖板，将深孔板区的固定框（见参考图 3-14）取下，然后放置一个全新干净的深孔板（见图 3-15），按照 A1 号孔位为最左上方的方向放置，再依次放置固定框，盖上深孔板的盖板；

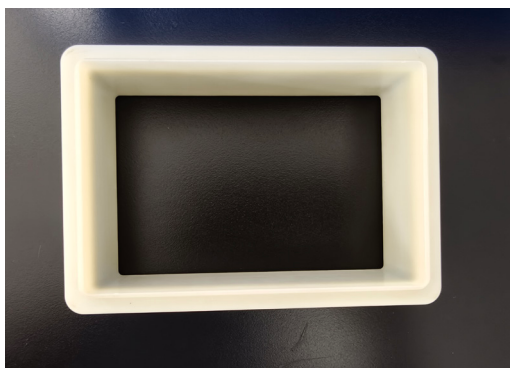


图 3-14 深孔板区的固定框

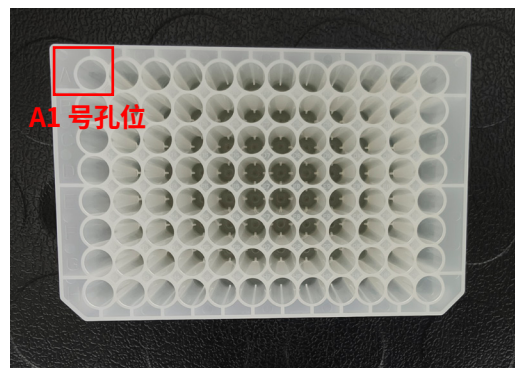


图 3-15 深孔板

- 3) 温控盖板放置：试剂和深孔板放置完毕后，按照图 3-16 将白色的温控盖板盖上低温试剂区和深孔板区。



图 3-16 温控盖板

（右上，为深孔板区盖有盖板的正确状态；右下，为低温试剂区未盖上盖板的错误状态）

3.7.5. 载具安装

- 上机试剂和耗材摆放无误，芯片拍照后，将芯片拿到 Go Spatial 附近干净的实验台面上；
- 用镊子将盖玻片轻轻推至载玻片边缘，直到芯片与盖玻片完全分离；用无尘纸擦拭芯片周围液体（图 3-17）；

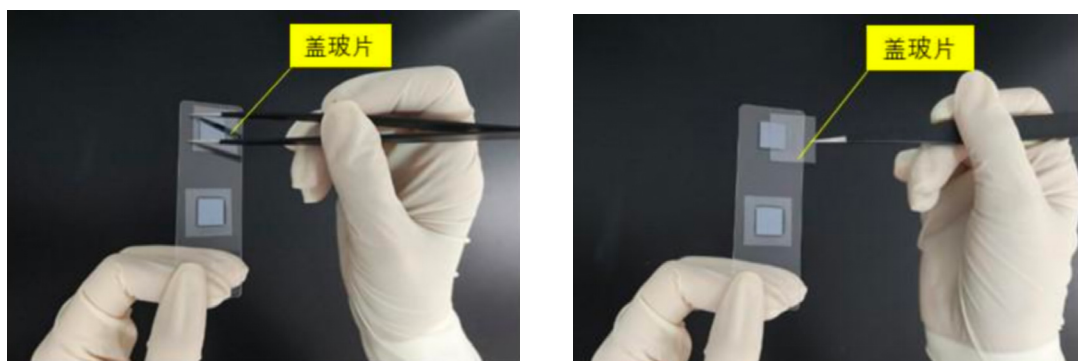


图 3-17 盖玻片移除操作



 试剂和耗材摆放无误后，再揭盖玻片进行上料。无需清洗芯片，仪器会执行清洗动作。

- 按照《[Stereo-seq V3 载具使用说明书](#)》将垫圈与载具上盖、底座组合成载具，并将芯片载体固定于载具上，组合成适用于 Go Spatial 上机的载具，参考 3.7.6 章节进入“程序信息录入”的步骤。

3.7.6. 程序信息录入

- a. 流程运行：点击页面左下方的“流程运行”，将进入实验信息填写界面，如图 3-18 的所示；

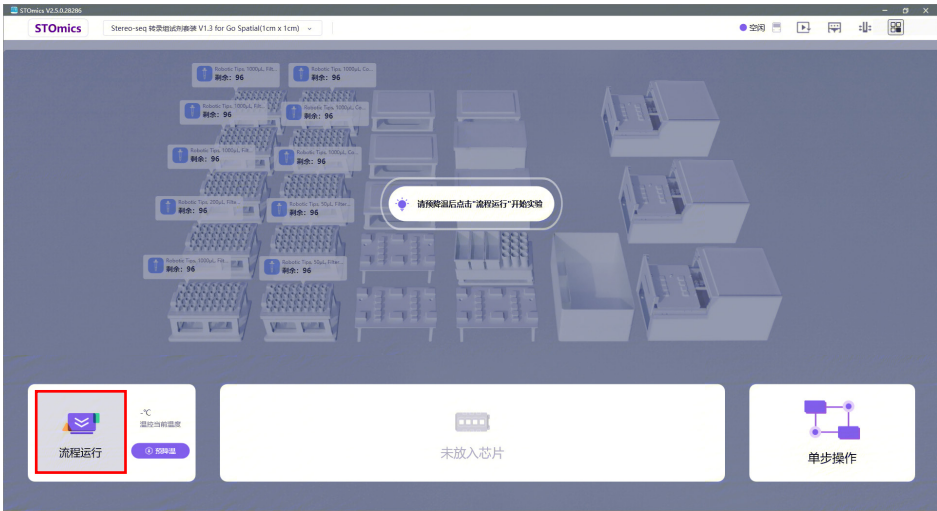


图 3-18 流程运行界面

- b. 信息录入：点击流程运行后，进入“芯片扫码”界面。选择即将上料的芯片将要使用的对应反应模块，录入实验信息，包括芯片 ID、样本编号、样本类型、组织类型、透化时间及实验员邮箱。图 3-19 展示的是芯片载体 C-1 的录入页面；



3 个独立的反应区 C、B、A 可以设置 3 个不同的透化时间，透化时间设置范围是 3 - 30 min；但是单个反应区，仅能设置为同一个透化时间。透化时间越长的样本，需要优先上机。

例如 3 组样本，透化时间分别是 24 min，18 min 和 12 min，则需要在上样区 C, 放置 24 min 透化时间的样本; 在上样区 B, 放置 18 min 的透化时间的样本; 在上样区 A, 放置 12 min 透化时间的样本。

软件默认需要仪器配制 10X 透化酶，请确保 A1 孔位已放置 PR Enzyme 透化酶干粉。若使用先前运行剩余的 10X 透化酶母液，不需要仪器再次配制 10X 透化酶，请点击取消勾选“配制 10X 透化酶（PR Enzyme）”选项，具体操作见图 3-20 和 3-21。

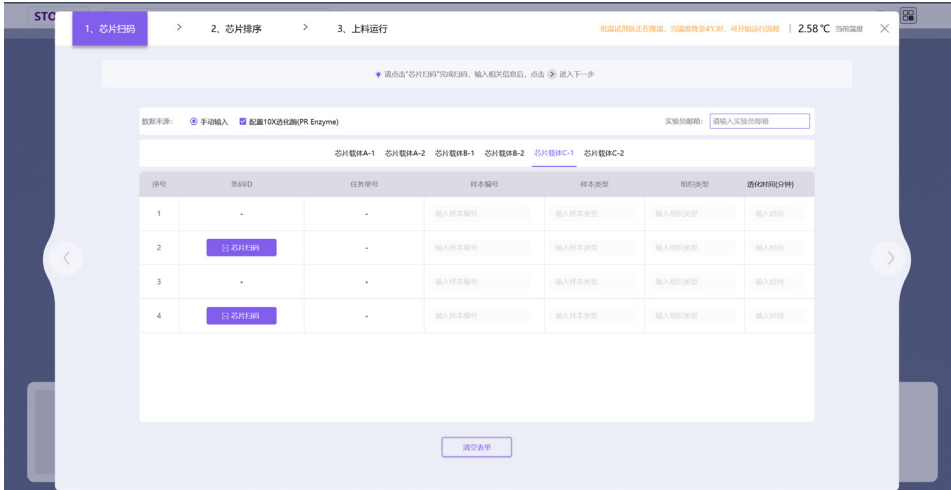


图 3-19 STOmics 软件芯片信息录入界面

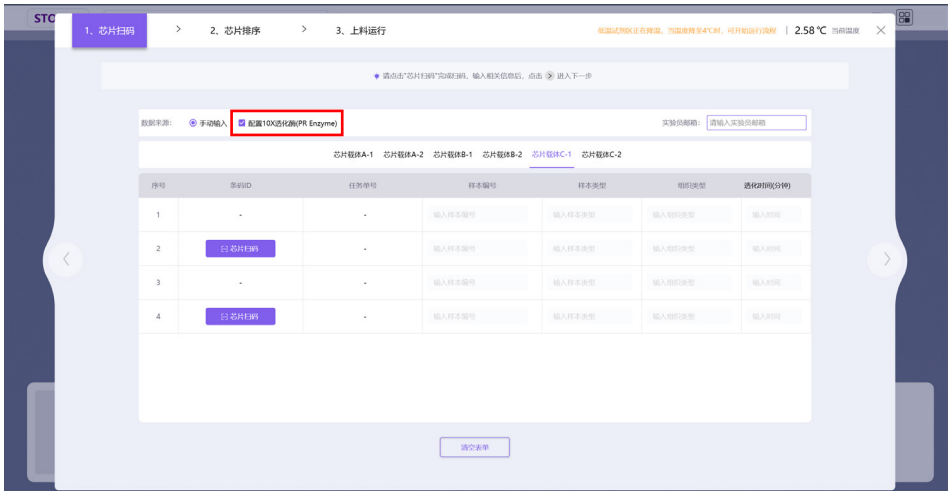


图 3-20 C 模块信息录入界面，点选取消透化酶配制选项

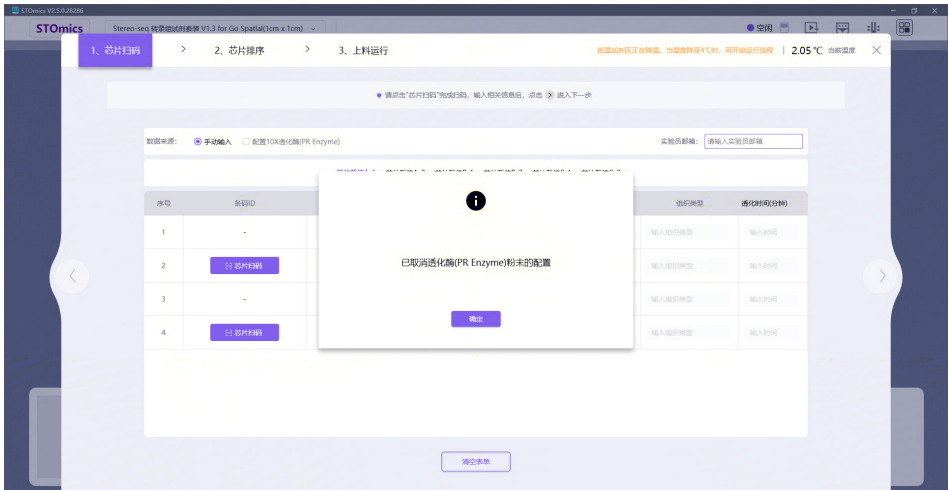


图 3-21 取消透化酶配制确认界面图

芯片 ID 录入说明：

芯片 ID 录入有两个方式：扫码输入（a）和 手动输入（b）：

(a) 扫码输入

把载具放置在外置扫码器上，让扫码窗口对准芯片背面的 ID 码（图 3-22，图 3-23），点击软件界面中的“芯片扫码”按钮（图 3-19），便可以读取芯片背面的编号，机器读取到的编号会显示在软件中。扫描的时候注意，载具上面的芯片位置号（2 号和 4 号）需要和软件界面中的序号保持一致。

(b) 手动输入

鼠标点击录入框，键入芯片 ID 号即可。



图 3-22 外部扫码器

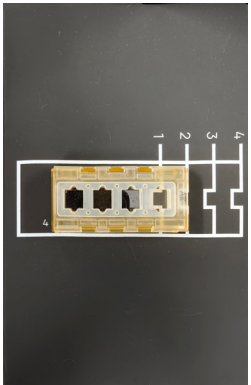


图 3-23 芯片扫码

c. 信息录入：如图 3-24 所示，完成所有样本的信息输入；

序号	样品ID	任务序号	样本编号	样本类型	组织类型	消化时间(分钟)
1	-	-	输入样本编号	输入样本类型	输入组织类型	输入时间
2	Y40104A2	-	1325	Mouse	Brain	12
3	-	-	输入样本编号	输入样本类型	输入组织类型	输入时间
4	Y40104A3	-	3895	Mouse	Brain	12

图 3-24 样本信息录入

d. 信息确认：点击下一页，进行图 3-25 所示的页面，再次确认录入信息，确认无误后点击下一步按钮。

1
无芯片
12 min

2
Y40104A2
12 min

3
无芯片
12 min

4
Y40104A3
12 min

图 3-25 样本信息确认

3.7.7. 流程开始

- a. 点击下一步按钮后，进入如下图 3-26 的“上料运行”界面。请确保所有试剂耗材已如软件界面提示的位置放置；

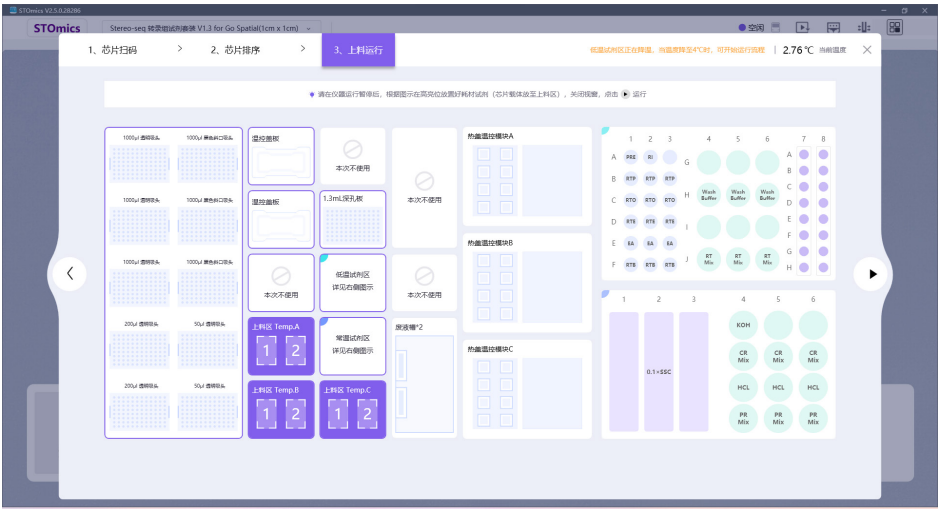


图 3-26 上料运行界面

- b. 将载具按照图 3-27 所示的正确方向放置在上料区，手柄端在顶部，可在载具上简单标注芯片信息及上样位置；

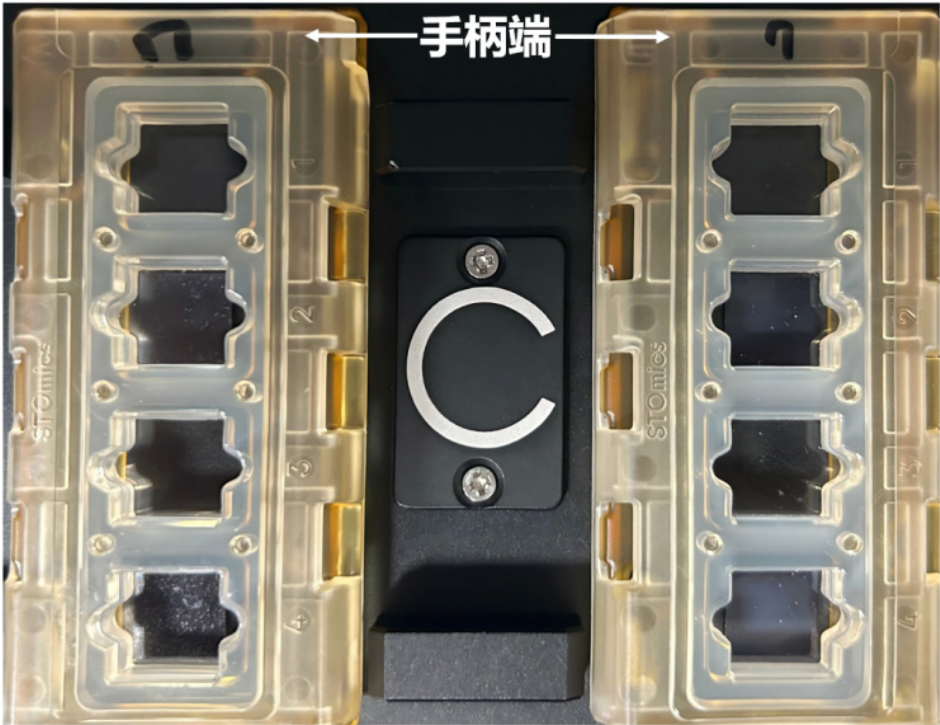


图 3-27 上料区 C 上的芯片载具放置示意图

- c. 所有试剂耗材核对放置无误后，手动关闭设备舱门，点击下一步按钮，会弹出如图 3-28 所示的“是否确定开始”弹窗，点击“确定”，实验流程开始运行。此时设备舱门会自动锁上。



图 3-28 STOmics 软件流程确定开始界面

3.7.8. 多模块上样

Go Spatial-V2-24 适配 FF 转录组 V1.3 应用，采取模块化分时上样模式，推荐按照“上料区 C→上料区 B→上料区 A”的顺序进行多模块上样。

- a. 多模块上样准备：确认新模块运行所需的试剂耗材已准备充分，完成载具安装后，可准备录入芯片信息及新流程上样，详情参考 3.7.3 到 3.7.7 章节；
- b. 当上料区 C 的样本运行至“逆转录反应”阶段时，机器会发出蜂鸣声，软件弹窗提示“当前可上料”，如图 3-29 所示；此时点击软件页面左下方的“上料”按钮，即可进入“芯片扫码”页面（如图 3-30）；



在 FF 转录组 V1.3 流程中，当反应模块 C 进入“反转录反应”步骤时（约在运行开始后 40 min，以透化时间 12 min 计算为例），软件将开放上料区 B 和 A 的上样权限，窗口持续 2.5 hr。请务必在反应模块 C 完成反转录反应前，完成模块 B 和 A 的所有芯片上样，否则需待本次流程结束回收 cDNA 后，重启新流程再进行上样。

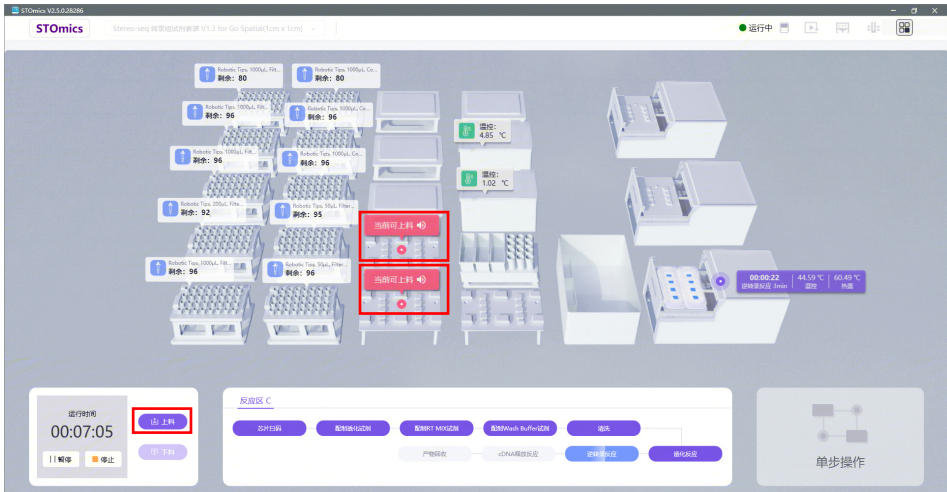


图 3-29 STOmics 软件提示可在其他上样区上样

- c. 如图 3-30 所示，选择上料区 B 对应的芯片载体的界面，扫描录入芯片 ID 信息；

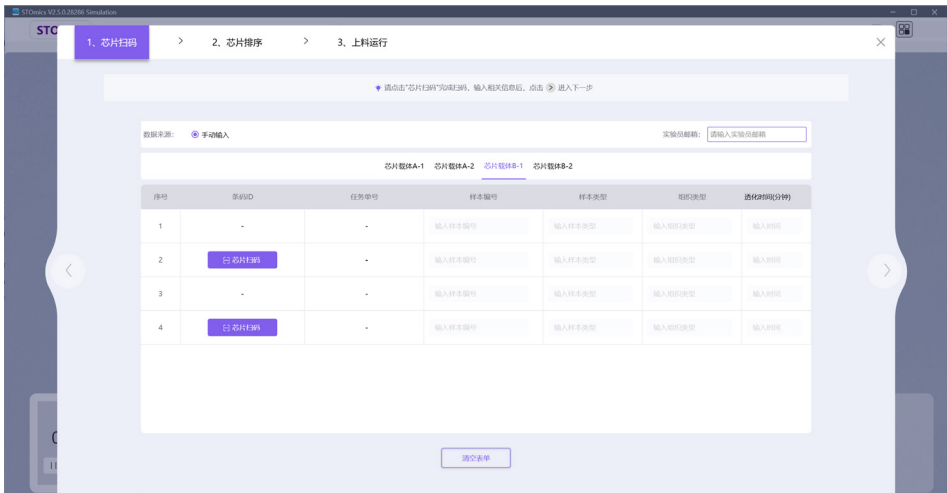


图 3-30 上料区 B 的芯片扫码界面

- d. 信息录入完毕后，点击下一页，进行图 3-31 所示的页面，再次确认录入信息，确认无误后点击下一步按钮；

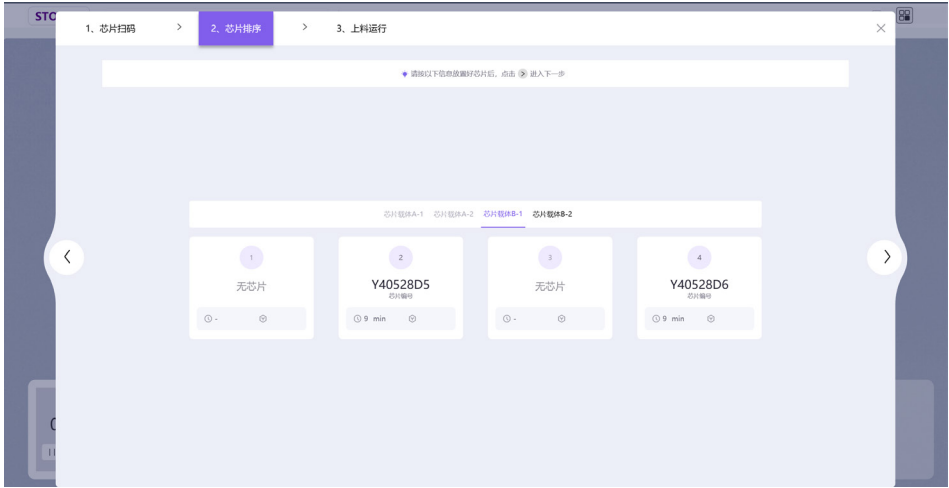


图 3-31 上料区 B 芯片信息确认界面

- e. 录入信息确认后，点击下一步按钮，进入如下图所示的上料运行界面，点击页面下方的“暂停仪器”按钮，如图 3-32，打开舱门，将芯片放置在上料区 B 对应位置，如图 3-33，便可关闭舱门；

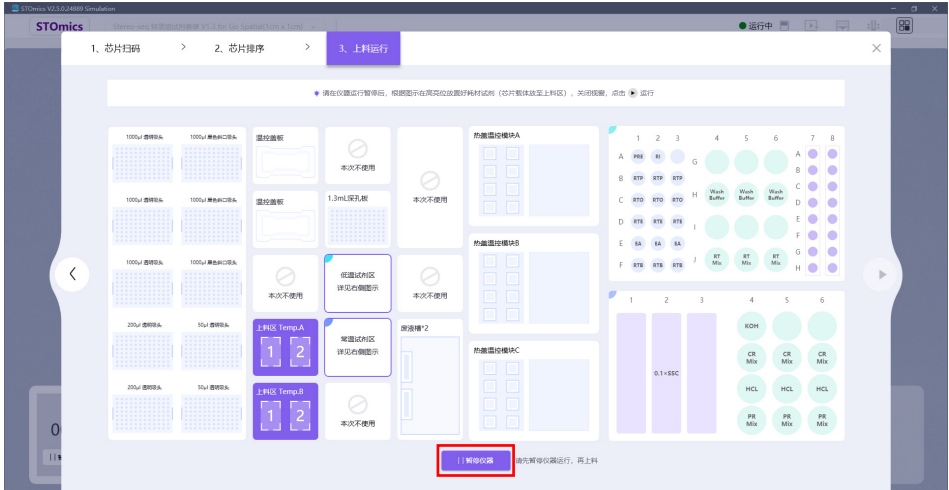


图 3-32 STOmics 软件流程暂停仪器多个上样区界面

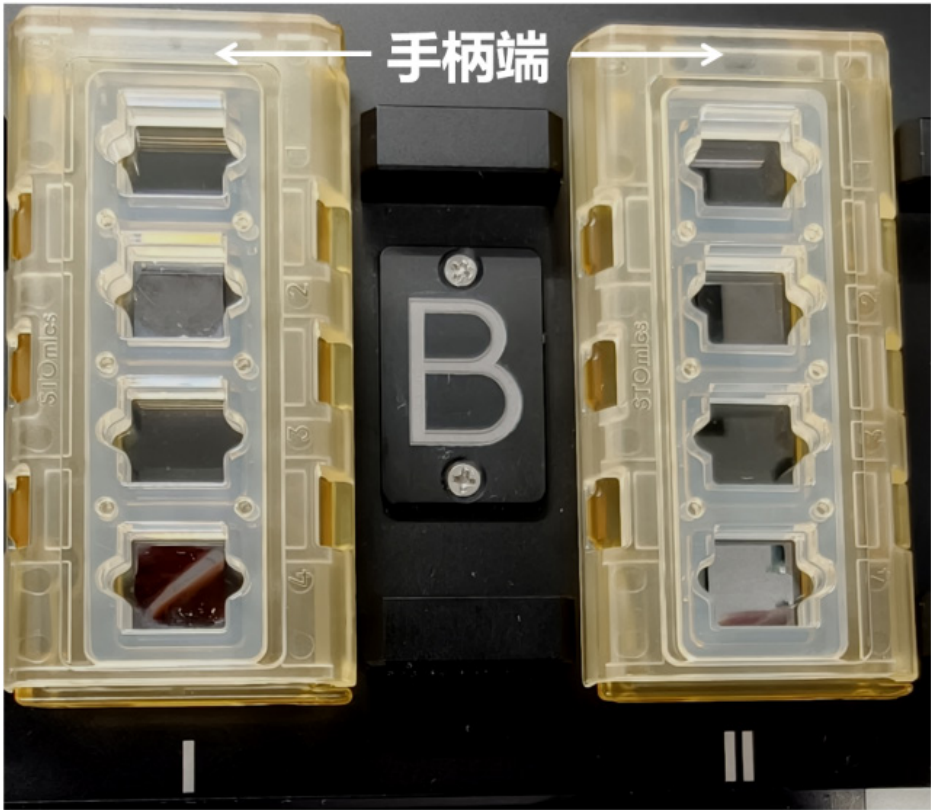


图 3-33 上料区 B 芯片载具放置示意图

- f. 载具放置完成后，点击下一步按钮，进入如图 3-34 所示界面，点击“确定”按钮，即可开始 B 模块的流程运行；

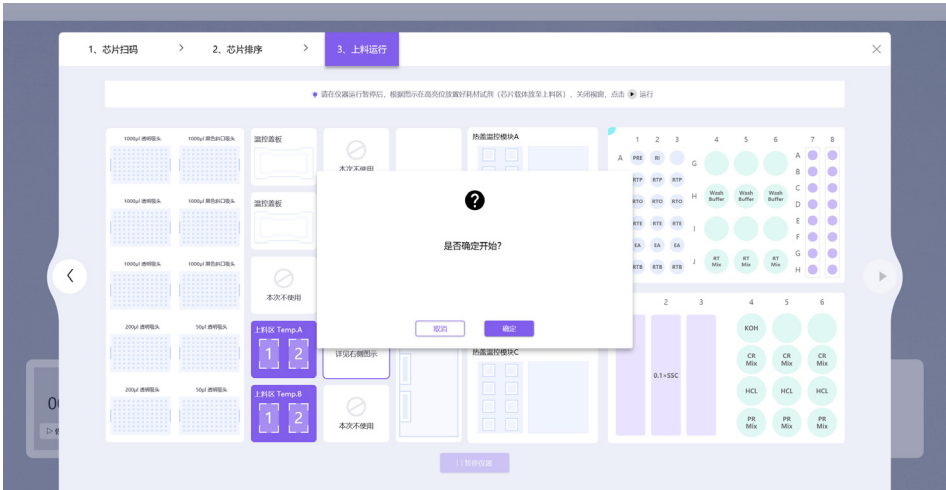


图 3-34 上料区 B 流程运行确认界面



- g. 重复 a. - f. 步骤 , 进行上料区 A 的芯片载具放置处理。
- ⚠ 若流程运行不在多模块上样窗口时，软件底部的“暂停仪器”会无法点击，提示该步骤无法进行新模块上样（图 3-35）。

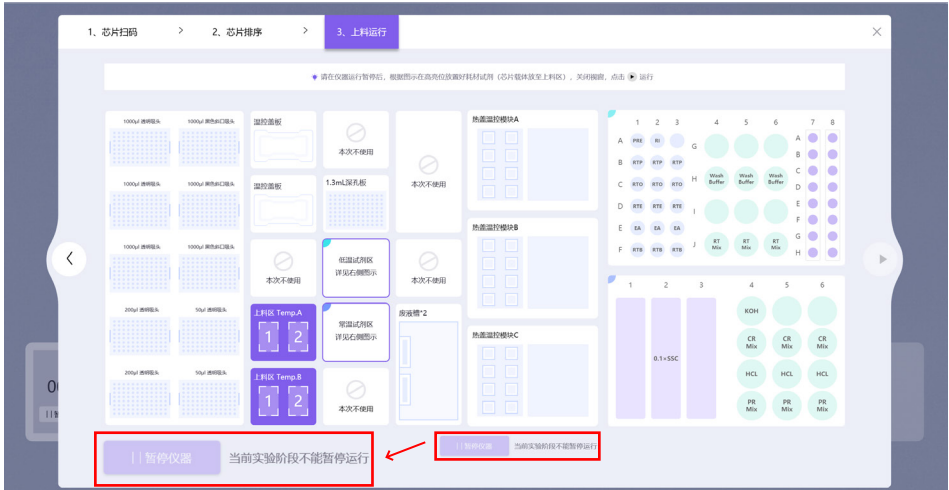


图 3-35 STOmics 软件流程至非上样窗口时的界面

3.7.9. 流程结束和 cDNA 回收

一. cDNA 产物及剩余试剂回收：

- a. 应用流程运行结束后，会弹出“是否停止所有温控”的弹窗（图 3-36），暂时不操作软件界面，直接打开设备舱门，平稳小心地从深孔板区拿出 96 孔深孔板，释放后的 cDNA 产物存储于此；

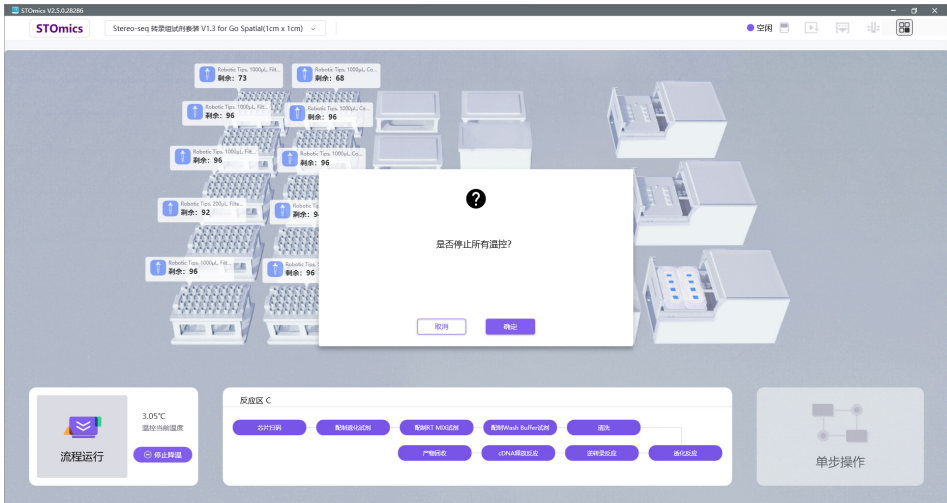


图 3-36 STOmics 软件流程结束界面

cDNA 产物回收孔位说明：

96 孔深孔板第 1 至 3 列分别对应模块 A 至 C，各列 A、B、C、D 行依次对应 I 区近手柄 2 号位、I 区远手柄 4 号位、II 区近手柄 2 号位、II 区远手柄 4 号位。若仅使用单一放置区（I 区或 II 区），所有产物按 2 号位、4 号位的先后顺序统一回收至对应列的 A、B 两孔，不留空跨行。回收逻辑示意图 3-37 & 图 3-38。

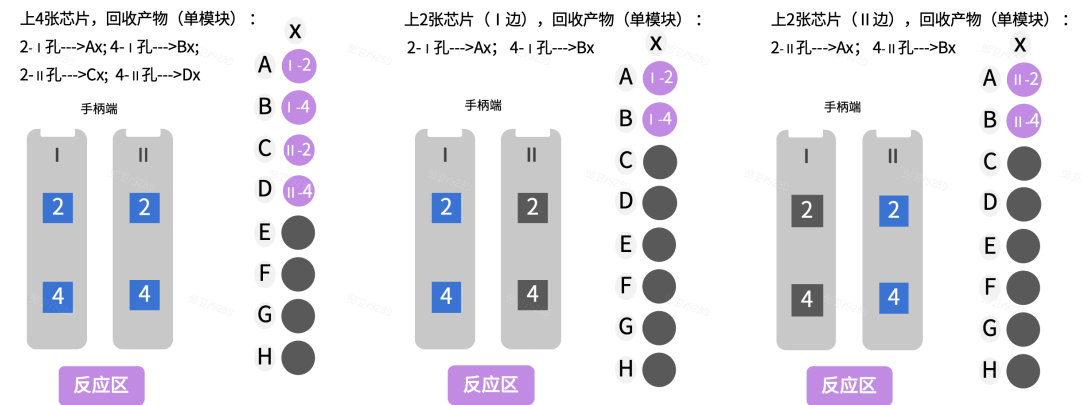


图 3-37 单模块 cDNA 产物存放于深孔板的位置

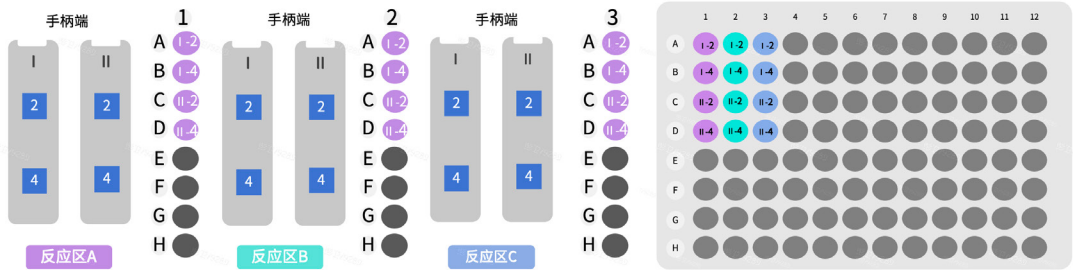


图 3-38 多模块 cDNA 产物存放于深孔板的位置

b. 参考图 3-39 示意的步骤，将 cDNA 产物从深孔板的孔中转移至新的 1.5 mL 离心管中，在管盖上记录好相关样本信息及 cDNA 回收量。

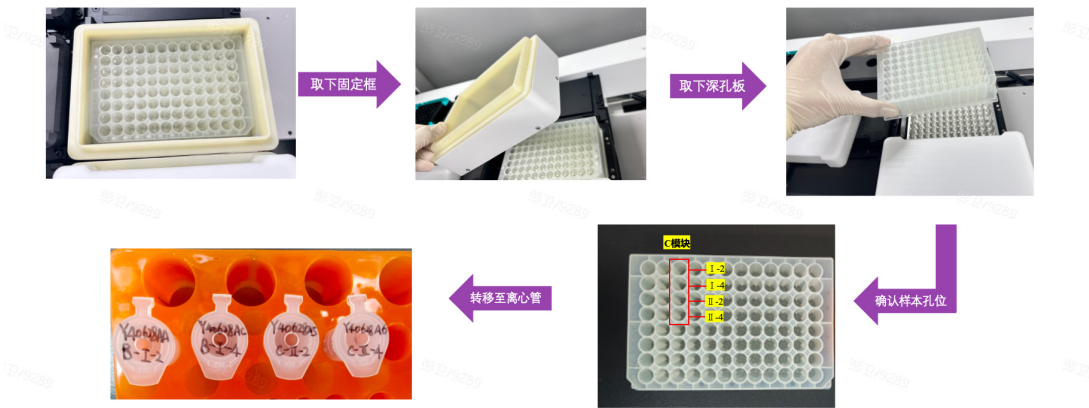


图 3-39 深孔板取出示意图

回收注意事项（重要）：从深孔板回收至 1.5 mL 离心管时，请严格按照以下步骤：

- 1) 因深孔板中的产物可能挂壁在孔位内壁，请先使用 10 μ L 移液枪（调整到 10 μ L 液量），配合 10 μ L 枪头，对内壁产物进行回收；
- 2) 然后使用 200 μ L 的移液枪（调整到 160 μ L 液量），配合 200 μ L 枪头，进行底部产物回收；
- 3) 最后再次使用 1) 方式，对孔内底部产物进行多次回收，直至深孔板中所有产物被回收。

二．试剂回收及关闭所有温控：

a. 取出剩余试剂。若单个反应模块仅使用了两个芯片的反应量，需要回收剩余试剂，请使用新的 0.5 mL 试剂管盖（MGI, Cat. No. 1000000981），将试剂密封盖好，避免污染；随后立即将剩余试剂装回试剂盒套装内，放置 -20 $^{\circ}$ C 保存；



温控提示的弹窗出现时或点击“取消”按钮后（图 3-36），低温试剂区仍会保持在 4 $^{\circ}$ C 及以下，请本阶段及时回收剩余试剂；待试剂以及 cDNA 回收完成后，再停止所有温控。

b. 确定试剂已回收后，点击图 3-36 的“确定”即结束全流程，此时低温试剂区的温控停止，温度逐渐恢复至室温。

3.7.10. 设备机舱清洁

- a. 流程结束后，清空台面实验剩余的试剂耗材等；使用无尘布擦拭低温试剂区模块底部的冷凝水（如有），并用 75% 乙醇擦拭 3 个反应区热盖，具体操作见图 3-40 到图 3-46；

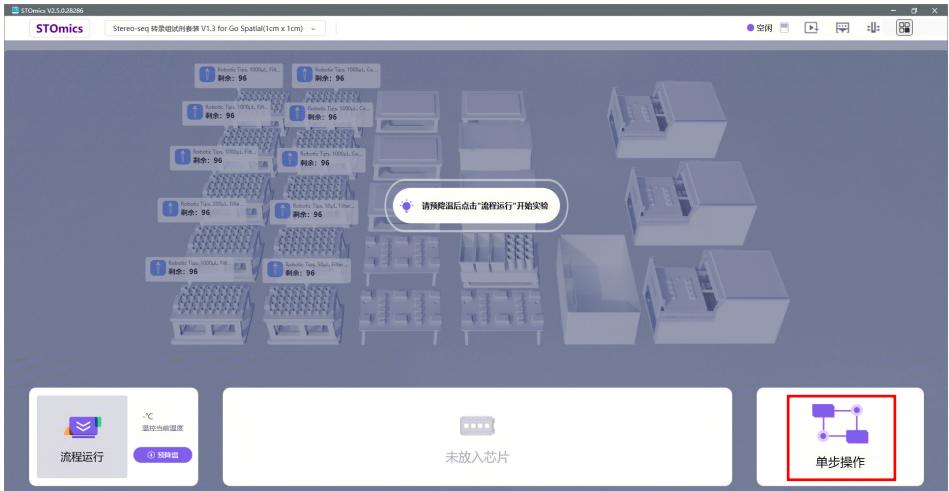


图 3-40 点击界面右下角“单步操作”



图 3-41 依次选择 A、B、C 模块的温控热盖，点击“关门”，使热盖弹出



图 3-42 双手按压两侧的卡扣，打开热盖

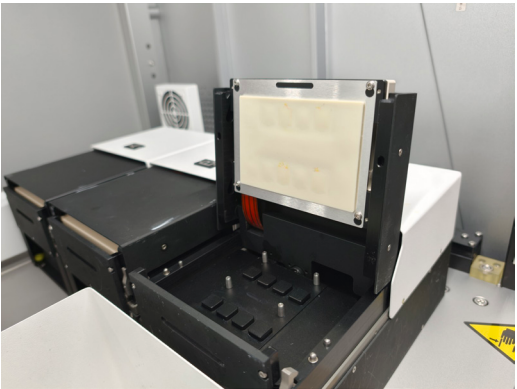


图 3-43 热盖打开

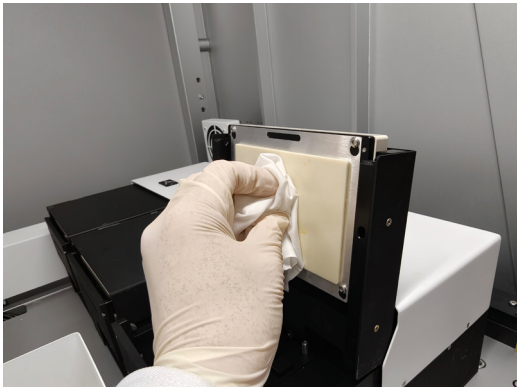


图 3-44 用喷洒 75% 乙醇的无尘布擦拭热盖



图 3-45 双手按压两侧卡扣，关闭热盖



图 3-46 缩回反应热盖，保持“开门”状态（需依次操作 3 个反应模块的热盖）



下轮实验开始前，需确认 3 个反应模块的热盖是处在“开门”状态（即反应热盖缩回）。若处在“关门”状态（即反应热盖伸出），夹爪转移载具的时候会撞到热盖，导致实验失败。

- b. （可选）推荐每天实验完成后，开启设备自带的清洁功能，进行紫外消毒。开启消毒步骤如图 3-47，消毒流程时长为 30 min；



图 3-47 STOmics 软件进行紫外消毒的步骤示意图



开启紫外消毒时，请确保全程周围没有人，并避免直视灯光；同时，需确认 3 个反应模块的热盖是处在“开门”状态（即反应热盖缩回）。

- c. 消毒结束后，收拾好机舱内的所有试剂物料耗材后，关闭 Go Spatial 主机、电控箱、接通外置扫码器、电脑主机与显示器的电源。

3.8. cDNA 变性

- a. 测量 cDNA 回收液体积，cDNA 回收量通常在 180 μL 左右。不同 cDNA 回收量的 Neutralization Solution 用量参考表格 3-4。加入 Neutralization Solution 后的体积若不足 198 μL ，可直接用 Nuclease-Free Water 补足；

表格 3-4 Neutralization Solution 用量对照表

cDNA 回收体积 (μL)	Neutralization Solution (μL)
170 - 180	23
180 - 190	24
190 - 200	25

- b. 将混匀后的溶液分装到 3 个 PCR 管中，每管分装约 66 μL ，按如下程序反应：

温度	时间	循环数
105°C 热盖	on	-
95°C	5 min	1
12°C	Hold	1



此步骤后，请再次确认载体上所有芯片背面的编号，并确保所有芯片编号与产物收集管标号准确对应。



请将释放后的芯片放置 4°C 冰箱暂存，待整个实验和分析流程完成后再丢弃。

3.9. cDNA 扩增

- a. 按照表格 3-5 配制 PCR Mix，吹打混匀后瞬时离心，冰上保存；

表格 3-5 PCR Mix

组分	1X (μL)	2X + 10% (μL)	3X + 10% (μL)	4X + 10% (μL)
4× cDNA PCR Mix	76.5	168.3	252.5	336.6
cDNA Primer	12	26.4	39.6	52.8
Nuclease-Free Water	13.5	29.7	44.5	59.4
Total	102	224.4	336.6	448.8

- b. 向 3 个 PCR 管的变性后 cDNA 中分别分装 34 μL PCR Mix，涡旋混匀；
c. 瞬时离心，按照表格 3-6 程序进行扩增；

表格 3-6 PCR 扩增程序 (反应体系 100 μL)

温度	时间	循环数
105° C 热盖	on	-
95° C	5 min	1
98° C	20 s	13
58° C	20 s	
72° C	3 min	
72° C	5 min	1
12° C	Hold	-

- d. 按照表格 3-7 配制 Qubit dsDNA Mix；

表格 3-7 Qubit dsDNA Mix

组分	1X (μL)
Invitrogen™ Qubit dsDNA HS Buffer	199
Qubit dsDNA HS Reagent 200X	1
Total	200

- e. 配制完成后，振荡混匀，取 199 μL 至新的检测管（Qubit dsDNA HS Assay Kit 配套检测管）；
f. 振荡混匀后取 1 μL PCR 产物，用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度并记录。



DNA 浓度通常高于 5 ng/μL。



若浓度低于 5 ng/μL，并且确认前面步骤无误的情况下，参考 [3.10.cDNA 纯化](#) 进行 1X 磁珠纯化，溶于 72 μL TE Buffer，回收 70.5 μL，加入 25.5 μL 4× cDNA PCR Mix 和 4 μL cDNA Primer，混匀离心后再 PCR 8 个循环（参考表格 3-6 PCR 扩增程序），继续参考 [3.10.cDNA 纯化](#) 步骤进行 0.8X 磁珠纯化完成操作。



3.10. cDNA 纯化

背景信息

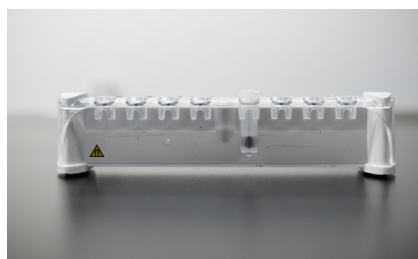
本试剂套装推荐使用 VAHTS DNA Clean Beads 或 AMPure® XP (Agencourt, Cat. No. A63882) 进行磁珠纯化。如果使用其他品牌的磁珠, 纯化条件需要重新摸索。

磁珠使用前

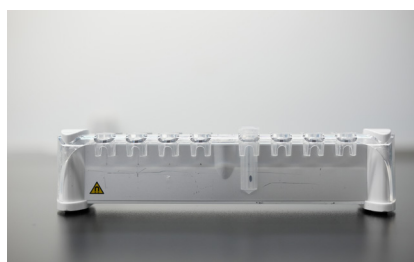
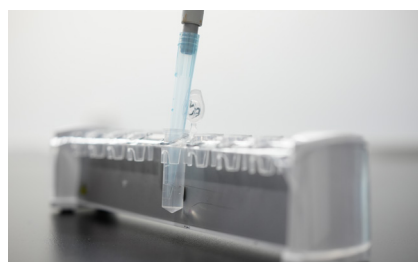
- 提前 **30 min** 从 4°C 取出, 涡旋混匀且平衡至室温, 有利于保证回收效率。
- 磁珠每次使用前, 需振荡或用移液器上下吸打, 确保充分混匀。
- 磁珠使用量直接影响纯化得到的 DNA 片段分布。磁珠用量越高, 纯化得到的 DNA 片段的下限长度越小。

磁珠操作注意事项

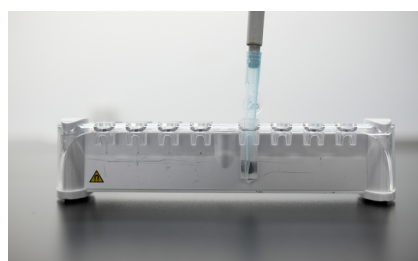
- 样本与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离时, 请于溶液彻底澄清后再吸取上清, 一般需要 **2-3 min**。但由于磁力架吸力不同等原因, 推荐分离时间有时可能需要延长, 以液体彻底澄清为准。



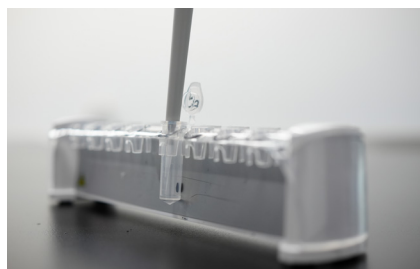
- 在分离磁珠与液体时, 注意吸头不可碰到磁珠, 最后可余留 2-3 μL 液体, 以避免吸到磁珠。若不慎吸到磁珠, 可将磁珠与液体全部打回管内, 再次分离后再吸取上清。



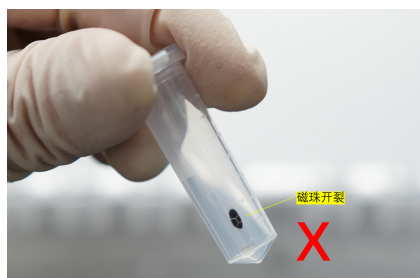
- 磁珠乙醇漂洗应使用新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇。漂洗过程中离心管应始终置于磁力架上, 移液器吸头应在远离磁力架的管壁上操作, 请勿吸打、搅动磁珠。



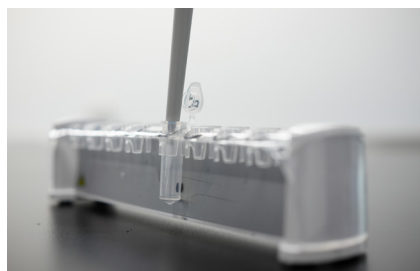
- 第二次乙醇漂洗应尽量吸干管底液体。若有少量液体残留在管壁，可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器把管底液体吸干。



- 两次乙醇漂洗后，应在室温下充分干燥磁珠。干燥不充分（磁珠表面反光）容易造成乙醇残留，影响后续反应，过度干燥（磁珠开裂）会降低回收得率。通常情况下，室温干燥需要 **5-10 min**，但由于室内温度和湿度的差异，干燥时间可能会不同，应随时观察。直至磁珠表面无反光，即可用 TE Buffer 或 Nuclease-Free Water 进行产物洗脱。



- 洗脱后吸取上清时，切忌触碰磁珠，若吸到磁珠可能会影响后续的纯化反应。所以，最终吸取的上清可比用于洗脱的 TE Buffer 或 Nuclease-Free Water 的体积少 $\sim 2 \mu\text{L}$ 。



- 在 1.5 mL 磁力架上开关管盖应避免剧烈震动导致磁珠或液体弹出，建议用手指固定住 1.5 mL 离心管中下段，然后开盖。



a. 对 PCR 产物进行 0.8X 磁珠纯化：

- 1) 将同一个 cDNA 的 3 管 PCR 产物混合到一起 (300 μ L)，与室温平衡好的磁珠按照 1:0.8 混合，振荡混匀，室温孵育 **10 min**；
- 2) 瞬时离心后，将 PCR 管放在磁力架上静置 **3 min**，待液体澄清后去除上清；
- 3) 将离心管保持在磁力架上，加入 600 μ L 80% 乙醇漂洗（新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇）。通过旋转磁力架上的离心管来漂洗磁珠。静置 **30 s**，小心吸取并丢弃上清。**移液器吸头应在远离磁力架的管壁上操作，请勿吸打、搅动磁珠**；
- 4) 重复一次步骤 3)；
- 5) 将离心管保持在磁力架上，打开盖子，室温风干 **5-8 min**，直至磁珠表面无反光、无开裂；
- 6) 加 100 μ L 的 TE Buffer 回溶，振荡混匀后室温静置 **5 min**，瞬时离心，磁力架静置 **3-5 min**，待液体澄清后将上清 (~98 μ L) 转移到新的 1.5 mL 离心管中。

— 停止点：

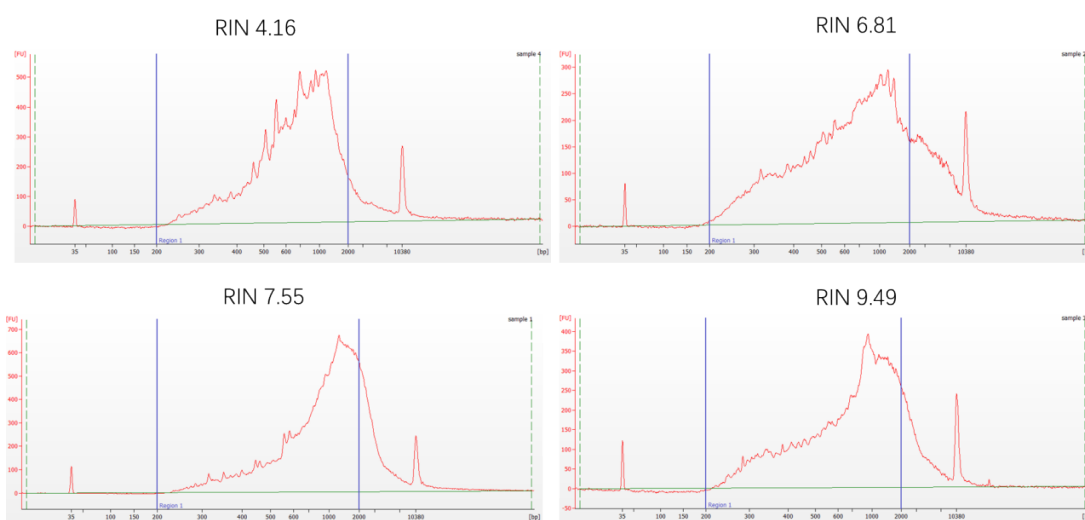
- cDNA 纯化产物可在 -20°C 下保存 1 个月。

QC 纯化后，可用 40 μ L Nuclease-Free Water 在 4°C 保存磁珠，直至 cDNA 最终产物 QC 通过。

b. 取 1 μ L 样品，用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度并记录；

通过 Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies)、LabChip® GX、GXII、GX Touch (PerkinElmer)、Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical) 等基于电泳分离原理的设备对 cDNA 片段分布进行检测。

QC 片段分布在 200-2000 bp 左右（如图二），纯化后产量通常大于 100 ng。



图二 . cDNA 扩增产物 2100 峰图

◎ 后续文库构建具体操作参考 [《时空转录组 FF V1.3\(含兼容 mIF\) 建库实验操作说明书》](#)。

! 注意：《Go Spatial 时空转录组 FF V1.3 转录组实验操作说明书》只能搭配《时空转录组 FF V1.3（含兼容 mIF）建库实验操作说明书》。

附录 A 同一试剂盒“2+2”模式上机实验操作指引

“2+2”模式上机：使用同一试剂盒，进行两次独立上样方式说明（以在 C 模块上样为例）：

Go Spatial-V2-24 适配 Stereo-seq FF V1.3 试剂套装的装量，支持进行 2 次独立实验（不同时间），每次实验上样 1 张玻片（含 2 张芯片）。



A.1：第一次上料操作

- a. 仪器准备及耗材放置以及试剂放置配制流程按照 3.7.2 至 3.7.4 章节进行常规操作。
- b. “芯片信息输入”仅输入一张玻片上 2 张芯片的信息（红色框标注）。其余按照 3.7.3 章节进行常规操作。

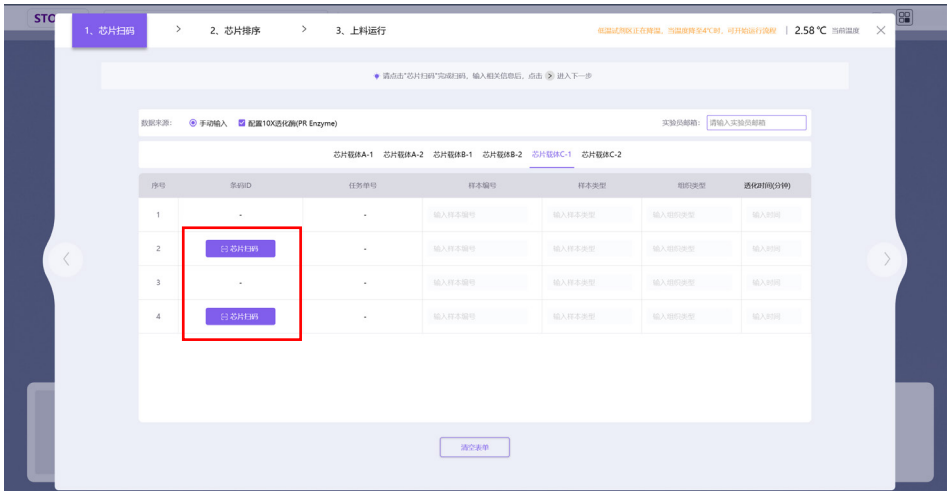


图 A-1 C 模块上料信息录入界面示意图



上机完成后注意回收剩低温试剂区剩余试剂，按照表格 A-1 提示使用新的管盖盖好后储存在 - 20℃。

表格 A-1 Stereo-seq FF V1.3 试剂盒中的试剂回收后的保存方式

孔位编号 *	台面代号	试剂名称	回收细节
A1	PRE	PR Enzyme	使用新的 0.5 mL 管盖（MGI,Cat. No. 1000000981）密封好试剂后，－20℃保存
A2	RI	RI	
B3	RTP	RT Plus	
C3	RTO	RT Oligo	
D3	RTE	RT Enzyme Mix	
E3	EA	Elute Additive	

A.2 第二次上样操作

- a. 试剂准备：将第一次上机回收并在－20℃保存的试剂提前解冻，上机前试剂进行瞬时离心。自配试剂按照 3.7.3 章节进行准备。
- b. 流程准备，耗材和试剂的放置，流程运行按照 3.7.2-3.7.4 章节操作。
- c. 信息录入：点击流程运行后，将进入“芯片扫码”界面。参考图 A-2 和图 A-3，点击取消软件界面“配制 10X 透化酶（PR Enzyme）”前的勾选项（见图 A-2）；跳出弹框“已取消透化酶（PR Enzyme）粉末的配置”（见图 A-3），点击确定。软件会取消 10X 透化酶粉末的配制步骤。

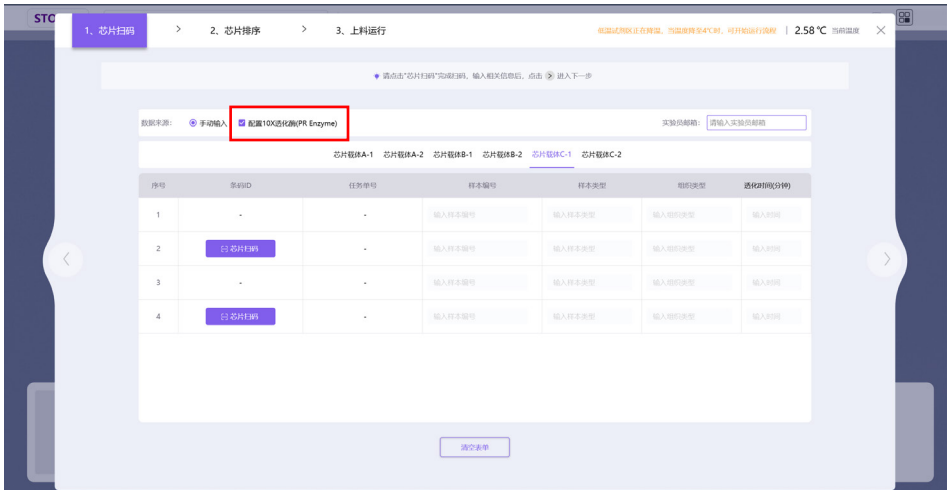


图 A-2 C 模块信息录入界面，点选取消透化酶配制选项

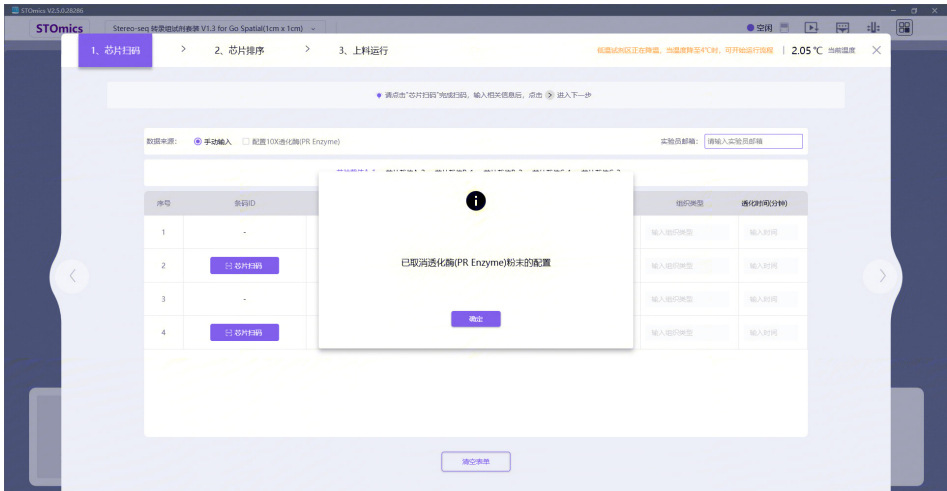


图 A-3 取消透化酶配制确认界面图

- d. 后续步骤参考 3.7.3 章节 继续进入到芯片信息录入，信息确认，安装载具，放置载具，确认运行过程中。

附录 B Go Spatial 时空转录组 FF V1.3 吸头使用数量参考

表格 B-1 列出了 Go Spatial 运行时所需的各类枪头数量。吸头消耗量因芯片数及使用模块数而异，表中数据为各芯片数量下吸头消耗最多的场景所对应的值。

表格 B-1* Go Spatial 时空转录组 FF V1.3 吸头使用参考表

芯片数量	1000 μL 透明枪头	1000 μL 黑色斜口枪头	200 μL 枪头	50 μL 枪头
2	17	14	2	4
4 (2+2)	33	28	4	8
6 (2+2+2)	49	42	6	12
8 (4+2+2)	55	56	8	10
10	61	70	10	8
12	67	84	12	6

* 本文档基于 STOmics 软件 V2.5.0.25398 版本的流程进行统计，不同版本的流程所需的吸头数可能存在差异，建议预留余量，防止因吸头不足造成实验失败。

附录 C 兼容 H&E 染色操作流程

请提前准备进行 H&E 染色所需的试剂耗材，见下表：

试剂		
品牌	描述	产品编号
Sangon Biotech	伊红 Eosin Y, free Acid	A600190-0025
Sigma ¹	苏木素 Hematoxylin solution	51275
Solarbio（国产备选） ²	天青石蓝苏木素	G4470
Agilent ²	返蓝试剂 Bluing Buffer	CS702
DAKEWE（国产备选） ⁴	返蓝试剂 Bluing Buffer	4960311-5

耗材		
品牌	描述	产品编号
-	一次性无菌注射器	-
津腾 ⁵	针筒式过滤器	JTSF0303
Millipore ⁵	Millex 针式过滤器	SLGV033N



 苏木素优先使用品牌 1，品牌 2 为国产备选。返蓝试剂优先使用品牌 3，品牌 4 为国产备选。
从含有相同序号上标的品牌中任选其一。

准备仪器	设置程序	备注
荧光显微镜	落射明场 BF-Epi 通道（H&E 染色）	检查显微镜是否有异常，必要时更换

3.4. 组织固定与伊红染色（- 20°C下操作）

- a. 孵育结束后，立即将芯片载体置于 - 20°C 预冷的甲醇中，确保甲醇浸没载体上的所有芯片，固定 **30 min**（固定时间最长不超过 **1 hr**）；
- b. 将芯片转移到 - 20°C 预冷的醇溶伊红溶液中染色 **3 min**，确保伊红溶液浸没过所有芯片（可根据组织着色均匀情况调整，染色时间控制在 **3-5 min** 的范围内）；



同一组织建议保持染色时间统一。

- c. 醇溶伊红染色结束以后，将芯片转移回刚刚固定的甲醇的容器中，继续 - 20°C 放置 **1 min**；
- d. 将容器转移到通风橱中，从容器中取出载体，用无尘纸吸干载玻片背面和周围多余的甲醇，确保无液体残留；
- e. 将载体竖立放在载玻片染色架上，在通风柜中通风 **4-6 min**，让甲醇充分挥发；



准备步骤 3.5 所需要的试剂，计算好用量备用并提前分装试剂，分装试剂请勿加入 RI。此时可检查显微镜已经打开并切换到（落射明场（彩色拍照），BF-Epi 通道模式）。

- f. 甲醇挥发干后，肉眼可见表面变干，将载体转移至实验台上，准备下一步染色。

3.5. 苏木素及返蓝染色



a. 根据【实验前准备】，提前配制 2 mL 0.01N HCl；参考下表提前配制好试剂；

在提前分装好的染液中加入 5% 体积的 RI，振荡混匀，请勿置于冰上，并控制在 5 min 内使用。如果同时做多张芯片载体，则需要按单张芯片载体的试剂用量现用现配。

试剂配制

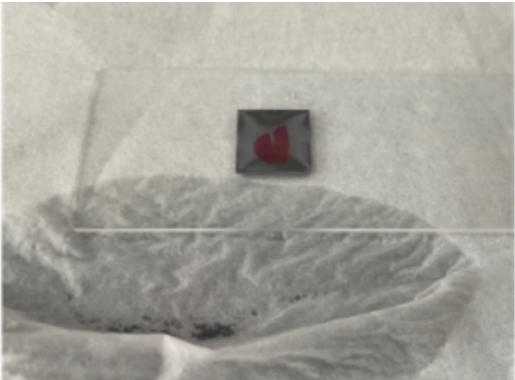
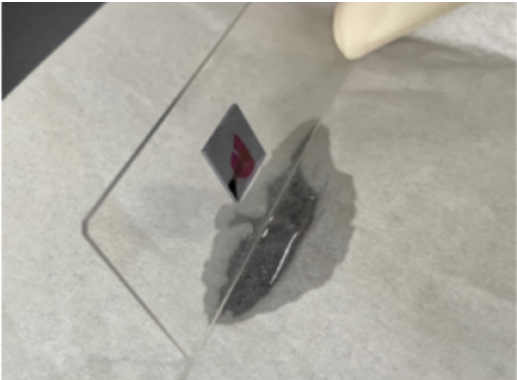
准备试剂	准备流程	储存
苏木素染色液（含 5%RI）	每张芯片至少准备 100 μL（95 μL 滤后苏木素 + 5 μL RI）	室温避光 5 min
Bluing Buffer（含 5%RI）	每张芯片至少准备 100 μL（95 μL Bluing Buffer + 5 μL RI）	室温 5 min

b. 在芯片表面滴加苏木素染色液 100 μL（含 5% RI）。先在芯片的每个角加入一滴染色液，然后将其余染色液加到芯片中央，使所有染色液融合，确保染色液均匀覆盖全芯片，室温孵育时间根据选择苏木素不同品牌调整；

推荐的 Sigma 苏木素染色时间为 7 min，Solarbio 苏木素染色时间为 1-2 min。提前将 H&E Mounting Medium 置于室温平衡 5 min。

c. 直接将芯片表面液体倾倒在无尘纸上（倾斜角度小于 60°），并用无尘纸吸去流出芯片的液体，尽量减少芯片表面液体残留；

d. 向芯片加入 Wash Buffer 进行清洗，用量为 100 μL/ 芯片，清洗后直接将芯片表面液体倾倒在无尘纸上（倾斜角度小于 60°），并用无尘纸吸去流出芯片的液体，尽量减少芯片表面液体残留；



e. 额外重复步骤 d. 2 次；

f. 将 Bluing Buffer（返蓝染色液，含 5% RI）滴加在到芯片上，用量为 100 μL/ 芯片。先在芯片的每个角加入一滴染色液，然后将其余染色液加到芯片中央，使所有染色液融合，确保染色液均匀覆盖全芯片，室温孵育时间根据选择返蓝染色液不同品牌调整；

推荐的 Agilent 返蓝试剂染色时间为 2 min，DAKEWE 返蓝试剂染色时间为 10 s。

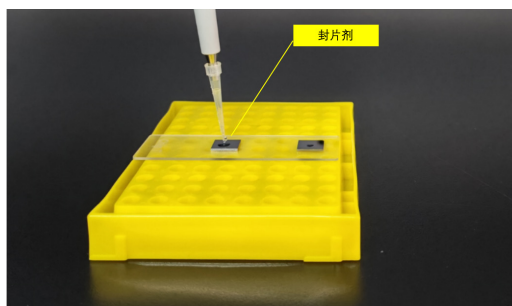
- g. 直接将芯片表面液体倾倒在无尘纸上（倾斜角度小于 60° ），并用无尘纸吸去流出芯片的液体，尽量减少芯片表面液体残留；
- h. 向芯片加入 Wash Buffer 进行清洗，用量为 **100 μ L/ 芯片**，清洗后直接将芯片表面液体倾倒在无尘纸上，（倾斜角度小于 60° ），尽量减少芯片表面液体残留，并用无尘纸吸去流出芯片的液体；
- i. 将芯片转移至无尘间的缝隙，一只手固定载体，另一只手持空气罐，出气口距离芯片一角 2-3 cm 位置，以大概 30° 倾角快速吹干芯片，注意吹干载玻片表面以及芯片与载玻片缝隙间的液体，可用无尘纸擦掉芯片周围的液体；

⋯ 请保证芯片与载玻片间的缝隙无液体残留，否则滴加 H&E Mounting Medium 后可能引起伊红晕开。

- j. 用移液器缓慢吸取 3.5 μ L H&E Mounting Medium 滴加到组织中央，避免产生气泡；

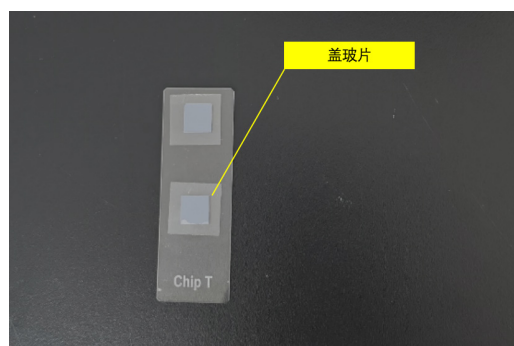
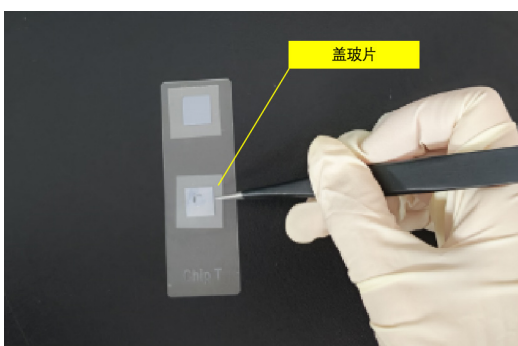
⋯ 滴加 H&E Mounting Medium 以后，建议立刻封片。

☰ H&E Mounting Medium 管盖颜色与 Glycerol 相同，使用时请注意区分。



⋯ 请保证盖玻片使用前干净无灰尘，可使用酒精擦拭盖玻片表面或者使用空气罐吹干净。

- k. 用镊子夹取盖玻片，小心将盖玻片的一端放在芯片边上，同时握住另一端，然后逐渐将盖玻片放低到芯片上直至完全覆盖芯片，待 H&E Mounting Medium 浸润整张芯片后，立即安排拍照。



3.6. H&E 染色拍照



a. 在显微镜控制软件中新建文件夹，以芯片号命名，也可适当注明其他相关信息；



文件夹名称只使用字母、数字、下划线，禁止使用空格等特殊字符。

例：B00249A1

b. 用显微镜的玻片夹将载玻片固定，如没有玻片夹，则在载物台上滴加 1-2 μL 水，将载玻片置于水滴上以起到固定作用如下图；



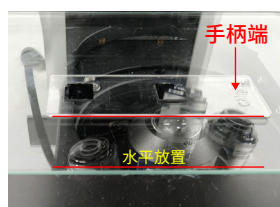
c. 载玻片轻放在载物台上，尽量与载物台平行；



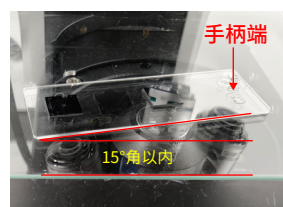
要求芯片边缘水平角度小于 15° ，芯片位置 chip T 手柄始终在右侧。



芯片位置图（背面）：芯片号在上，二维码在下



芯片位置图（正面）：手柄在右侧



d. 打开荧光显微镜，选择落射明场（彩色相机）模式；

e. 确定组织位置：选择 4X 物镜，将视野移动至芯片上的组织区域，调整亮度和曝光，调节焦距，直至视野内组织和细胞呈清晰状态；

f. 扫描地图：框选芯片区域，要求芯片完全在框选区域内且框选区域略微大于芯片，在 4X 物镜下扫描地图，以便确定正式扫描区域；



如果显微镜无扫描地图功能，直接跳过该步骤。

g. 调整显微镜倍数：将物镜调整至 10X，进一步调整框选区域，需确保芯片四个角在框选范围内，并尽量与芯片边缘重合；

h. 焦面确定：调节焦距，直至视野内组织和细胞呈清晰状态；

i. 白平衡：判断组织区域颜色是否正确，如果有问题，选择无组织区域和干净无杂质的区域，进行白平衡校正；

j. 背景平衡：将视野移至芯片空白区域，进行背景平衡。选择无组织区域和干净无杂质的区域，调整细准焦螺旋 / 鼠标滚轮进行散焦（z 轴浮动 ± 200 以内），如果先前选择的区域中有小杂质，散焦后应该几乎不可见，区域内的 Track 线也不可见，最后选择“背景平衡”；

- k. 再次定焦：调节焦距，直至视野内组织和细胞呈清晰状态；
- l. 对焦策略：将视野移至芯片空白区域，视情况微调亮度 / 曝光和焦距，直至芯片上的 Track 线清晰，在芯片不同的空白区域（建议在芯片四个角）建立 3-5 个建模点；将视野移至组织区域，视情况微调亮度 / 曝光和焦距，直至组织和细胞呈清晰状态且不过曝，选择组织中较关注的区域，设置建模点（建议组织区域内每平方厘米选择 3-5 个建模点，如果组织起伏较大，可以酌情增加建模点）；对于仅支持自动对焦策略的显微镜无需考虑本策略；
- m. 最终成像：完成建模后，随即进行扫描；拍照完成后，保存整个文件夹；
- n. 打开“StereoMap->Tools->imageQC”模块，拖入 H&E 染色图，并参考软件内置的《StereoMap 用户手册》来进行图像质控。

◎ 更为详细的注意事项请参考 [《Stereo-seq 空间多组学技术成像指南》](#)。



获得的 H&E 染色图需要 Track 线质控通过才能自动化进行后续的数据分析（如，自动配准）。



如果 QC 失败，请仔细检查图像清晰度，调整拍照方法进行二次拍照以确保可以获得清晰的组织及 Track 线图像。若二次拍照 QC 仍失败，可以继续实验，实验结束可联系 FAS 帮助排查问题，或借助 StereoMap 手动图像处理。



拍照完成后，H&E Mounting Medium 封片的组织在常温最长可以存放 2 hr，针对 RNA 容易降解的组织，如胰腺，立即进行后续操作以避免 RNA 降解。



请返回参考 [3.7.Go Spatial 运行流程](#)，继续实验操作。